

THESIS / THÈSE

LICENCE EN BIOLOGIE

Biosynthèse de la Cathepsine D dans des cellules HepG2. Effet d'une surcharge lysosomale

Thyes, Patrick

Award date:
2001

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Biosynthèse de la Cathepsine D dans des cellules HepG2.
Effet d'une surcharge lysosomale.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Licencié en Sciences biologiques**

Patrick THYES

Juin 2001

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Biosynthèse de la Cathepsine D dans des cellules HepG2. Effet d'une surcharge lysosomale.

THYES Patrick

Résumé

La Cathepsine D est une endopeptidase lysosomale à aspartate apparentée à d'autres protéases à aspartate non-lysosomales comme la rénine et la pepsine. Le ciblage vers les lysosomes de cette enzyme se fait via la voie du Mannose-6-Phosphate. La Cathepsine D est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif qui subit, pendant son trajet vers les lysosomes, deux clivages protéolytiques menant vers les formes intermédiaire et mature de l'enzyme. Les lysosomes constituent le site de dégradation majeur dans la cellule. Ils se caractérisent par une densité élevée. Cette densité importante peut être liée à la formation d'une matrice insoluble dans l'organite. La fonction de cette matrice est inconnue. Au cours de ce travail, nous avons tenté d'étudier le rôle que pourrait jouer la matrice intralysosomale dans la biosynthèse d'une hydrolase lysosomale, en choisissant la Cathepsine D comme modèle. La première étape de nos travaux a consisté à suivre la biosynthèse de la Cathepsine D dans les cellules HepG2, pour mettre en évidence les trois formes moléculaires de cette protéine. Dans un deuxième temps, nous avons soumis les cellules HepG2 à une surcharge lysosomale, un traitement qui conduit à la disparition des lysosomes denses. Nous avons suivi la maturation protéolytique de la Cathepsine D dans ces cellules. Nos résultats indiquent que le saccharose inhibe le deuxième clivage protéolytique de l'enzyme. Des expériences de maturation, réalisées *in vitro*, ont confirmé les résultats obtenus à partir de cellules intactes. L'ensemble de nos résultats s'accordent avec l'hypothèse d'un rôle joué par la matrice insoluble du lysosome, dans la biosynthèse de la Cathepsine D.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2001

Promoteur: M. Jadot

Remerciements

Arrivé au terme de ce mémoire, je tiens à remercier le Prof. M. Jadot pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour m'avoir suivi et guidé pendant mon travail avec une grande disponibilité et beaucoup de patience, et pour m'avoir appris une méthode de réflexion scientifique.

Je désire remercier le Prof. S. Wattiaux-De Coninck pour son travail de longue haleine dans la correction de ce texte et pour ses conseils précieux.

J'aimerais remercier tout particulièrement Monsieur Dubois pour m'avoir suivi et guidé dans les manipulations que j'ai réalisées au laboratoire, d'avoir consacré son temps pour effectuer plusieurs contrôles nécessaires de mes résultats, et pour m'avoir donné la possibilité de profiter de son expérience.

Je voudrais aussi remercier le Prof. R. Wattiaux pour son esprit critique dans la finalisation de ce travail.

Je remercie le Prof. Y. Poumay pour avoir pris le temps de faire le travail de relecture de ce mémoire.

Je remercie également Isabelle, Michèle et Virginie qui n'ont jamais refusé de me donner un coup de main et je remercie toute l'équipe du Département de Chimie Physiologique pour m'avoir accueilli avec sympathie.

Un grand merci à mes parents pour leur confiance et pour m'avoir soutenu pendant si longtemps.

Ce mémoire est dédié à Tania.

Table des Matières

1 Introduction	1
1.1 Les organites du trafic intracellulaire	1
1.1.1 Le trafic membranaire	1
1.1.2 Les acteurs du trafic intracellulaire	1
1.1.2.1 Le réticulum endoplasmique (RE)	1
1.1.2.2 L'appareil de Golgi	2
1.1.2.3 Les endosomes	2
1.2 Les lysosomes	3
1.2.1 Généralités	3
1.2.2 Hétérogénéité des lysosomes	4
1.3 Biosynthèse des protéines lysosomales	5
1.3.1 Généralités	5
1.3.1.1 Biosynthèse des hydrolases solubles des lysosomes	5
1.3.1.1.1 La voie du Mannose-6-Phosphate	5
1.3.1.1.2 La voie indépendante du Mannose-6-Phosphate	9
1.3.1.2 Biosynthèse des protéines membranaires des lysosomes	10
1.3.1.2.1 Les glycoprotéines membranaires	10
1.3.1.2.2 Fonctions des glycoprotéines lysosomales membranaires	11
1.3.1.2.3 Ciblage des glycoprotéines lysosomales membranaires	12
1.3.2 Biosynthèse de la Cathepsine D	14
1.4 Biogenèse des lysosomes denses ("dense core lysosomes")	16
1.4.1 Généralités	16
1.4.1.1 Modèle de la maturation ("Maturation Model")	17
1.4.1.2 Modèle du transport vésiculaire ("Vesicle Shuttle Model")	17
1.4.1.3 Modèles de l'organite hybride ("Kiss and Run Model" et "Fusion-Fission Model")	18
1.4.2 Les "sucrosomes"	19
1.5 Objectif du travail	20
2 Matériel et Méthodes	21
2.1 Culture cellulaire	21
2.2 Fractionnement cellulaire	21
2.2.1 But de la manipulation	21
2.2.2 Matériel	21
2.2.3 Méthode	21
2.3 Dosage des activités enzymatiques	22
2.3.1 But de la manipulation	22
2.3.2 Matériel	23
2.3.2.1 Dosage de la Cathepsine C (enzyme marqueur des lysosomes)	23
2.3.2.2 Dosage de la β -Galactosidase (enzyme marqueur des lysosomes)	23
2.3.2.3 Dosage de la α -Glucosidase Alcaline (enzyme marqueur du réticulum endoplasmique)	24
2.3.3 Méthode	24
2.3.3.1 Dosage des activités enzymatiques	24
2.3.3.2 Dosage des protéines	25

2.4 Centrifugation en gradient de Percoll.....	25
2.4.1 But de la manipulation	25
2.4.2 Matériel	25
2.4.3 Méthode.....	26
2.5 Marquage métabolique de la Cathepsine D.....	26
2.5.1 But de la manipulation	26
2.5.2 Matériel	26
2.5.3 Méthode.....	27
2.6 Maturation in vitro de la Cathepsine D	27
2.6.1 But de la manipulation	27
2.6.2 Matériel	27
2.6.3 Méthode.....	28
2.7 Immunoprécipitation de la Cathepsine D.....	29
2.7.1 But de la manipulation	29
2.7.2 Matériel	29
2.7.3 Méthode.....	30
2.8 Mesure du pH intralysosomal.....	31
3 Résultats et Discussions.....	32
3.1 Introduction	32
3.1.1 Les "dense core lysosomes"	32
3.1.2 Existence d'une "matrice" intralysosomale.....	32
3.2 Centrifugation en gradient de Percoll.....	34
3.3 Biosynthèse de la Cathepsine D	37
3.4 Effet du saccharose sur la biosynthèse de la Cathepsine D.....	40
3.5 Maturation in vitro de la Cathepsine D	44
3.6 Effet du saccharose sur la maturation in vitro de la Cathepsine D.....	48
4 Conclusions et Perspectives.....	52
5 Bibliographie	55

Introduction

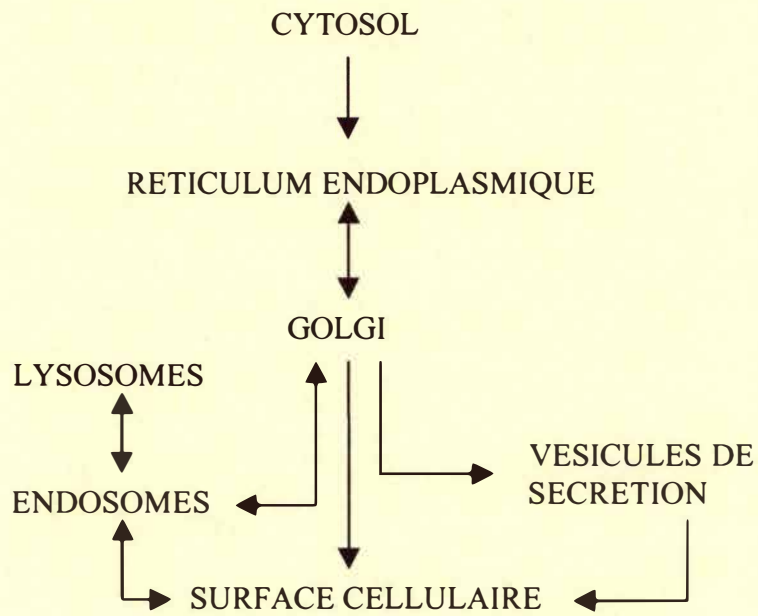


Figure 1.1 : Le trafic membranaire. Représentation schématique des organites impliqués dans la voie de la sécrétion. (Alberts, Bray ; Biologie moléculaire de la cellule)

1. Introduction

1.1. Les organites du trafic intracellulaire

1.1.1. Le trafic membranaire

Le trafic intracellulaire concerne les voies de la biosynthèse et de l'endocytose. La cellule contient de nombreux compartiments membranaires qui échangent continuellement leurs composants. Comment chaque compartiment parvient-il à maintenir son caractère spécialisé et son identité propre ? Quelle est le rôle, la nature et la composition de ces organites intracellulaires ? Nous décrirons brièvement les différents acteurs du trafic intracellulaire impliqués dans la voie de la sécrétion et plus particulièrement dans la biosynthèse des protéines lysosomales (**fig.1.1**).

1.1.2. Les acteurs du trafic intracellulaire

1.1.2.1. Le réticulum endoplasmique (RE)

Le RE est constitué d'un ensemble membranaire organisé en labyrinthe dont la surface globale est extrêmement importante. On distingue le RE lisse (REL) et le RE rugueux (RER).

Le REL est le siège du métabolisme des acides gras et des phospholipides. Particulièrement abondant dans l'hépatocyte, le REL y assure la détoxification de certains pesticides et carcinogènes en augmentant leur solubilité.

Le RER est le prolongement de l'enveloppe nucléaire externe. C'est l'endroit où s'achève la synthèse des protéines de la voie de la sécrétion débutée dans le cytosol. La voie de la sécrétion inclut tant le RE, le Golgi, la membrane plasmique, les endosomes, les lysosomes que les protéines sécrétées dans le milieu. C'est également dans le RER que débutent les modifications posttraductionnelles des protéines de la voie de la sécrétion. Ces modifications comprennent la formation de ponts disulfure, le repliement correct de la chaîne polypeptidique, le greffage d'oligosaccharides, des clivages protéolytiques spécifiques et l'association des protomères.

Les protéines mal repliées s'accumulent ou sont dégradées dans le RE. Le repliement correct est catalysé par des chaperonines comme Bip et PDI. Ce sont des protéines de liaison qui s'attachent temporairement aux segments hydrophobes accessibles des protéines et empêchent ainsi leur repliement incorrect et leur agrégation. Bip et PDI sont des protéines solubles qui sont retenues dans le RE grâce à leur séquence C-terminale *Lys-Asp-Glu-Leu* (KDEL) reconnue par le récepteur de KDEL. La séquence KDEL est nécessaire et suffisante à la rétention des protéines dans le RE. En effet, le récepteur de KDEL est localisé dans le RE mais aussi dans les vésicules de transport RE-Golgi (antérograde et rétrograde) et dans le *cis*-Golgi. Les enzymes qui se sont échappées du RE sont ramenées par les vésicules de transport.

1.1.2.2. L'appareil de Golgi

Le Golgi est constitué d'un empilement de sacs membranaires et on y distingue trois parties ; les régions *cis*, médiane et *trans*. Les protéines néosynthétisées quittent le RER via des vésicules de transport qui les mènent dans le complexe de Golgi. Elles passent d'une région à l'autre par un transport vésiculaire et arrivent au niveau du réseau *trans*-golgien (TGN). Le transport du RE vers le Golgi et au sein du Golgi se fait par des vésicules recouvertes de protéines COP. Chaque partie du Golgi se distingue par un contenu enzymatique différent qui poursuit les modifications posttraductionnelles des protéines. À partir du TGN les protéines continuent leur chemin pour aboutir soit aux lysosomes (via les endosomes), soit à la membrane plasmique ou dans le milieu extracellulaire. Cet ensemble constitue la voie de la sécrétion.

Les enzymes propres du Golgi telles la galactosyltransférase et la sialyltransférase qui modifient les glucides, possèdent une partie N-terminale cytosolique, une hélice α transmembranaire et une partie luminale contenant le site catalytique. Le segment transmembranaire est nécessaire et suffisant à la rétention de ces enzymes dans le Golgi.

1.1.2.3. Les endosomes

Les endosomes, ou système endosomal, sont des compartiments membranaires tubulaires et vésiculaires parmi lesquels les corps multivésiculaires ("MVB" ; Hopkins

et al., 1990). Les endosomes sont impliqués à la fois dans la voie de l'endocytose et de la biosynthèse. Au cours de celle-ci les protéines lysosomales néosynthétisées sont transportées à leur sortie de l'appareil de Golgi vers les endosomes précoces, puis vers les endosomes tardifs et de là vers les lysosomes. Dans les endosomes précoces, à pH acide, beaucoup de ligands endocytés se dissocient de leurs récepteurs. Ceux-ci sont alors recyclés vers la surface cellulaire (Mellman, 1996).

1.2. Les lysosomes

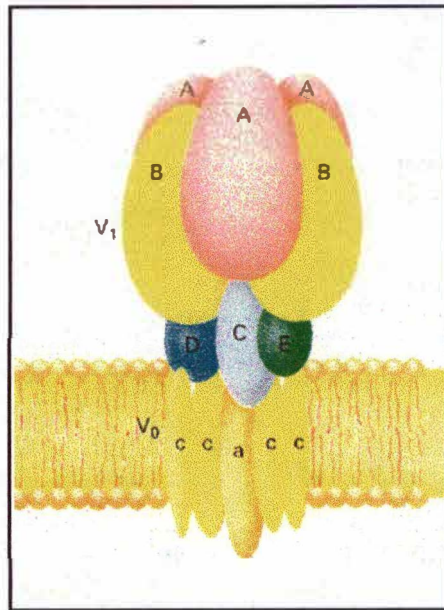
1.2.1. Généralités

Les lysosomes sont des organites que l'on retrouve dans les cellules eucaryotes. Ils sont entourés d'une membrane simple dont la taille va de 0,2 à 2,0 μm et leur forme peut être très variable. Présents dans une cellule en quelques centaines d'exemplaires, ces organites spécialisés sont le compartiment majeur de dégradation au sein du système membranaire de la cellule eucaryote.

Les lysosomes sont la destination finale du matériel d'endocytose, d'autophagie et de sécrétion prévus à la destruction (Mullins and Bonifacino, 2001). La dégradation par les lysosomes est un mécanisme critique dans beaucoup de processus physiologiques tels le turnover normal des protéines cellulaires, l'élimination de protéines anormales, la "down regulation" de récepteurs de surface, la libération d'éléments nutritifs endocytés, l'inactivation d'organismes pathogènes et la présentation d'antigènes. De plus, les lysosomes jouent un rôle crucial dans l'homéostasie d'ions métalliques et la réparation de la membrane plasmique.

L'identification morphologique des lysosomes est difficile vue leur hétérogénéité. Cependant on peut les repérer par la présence d'éléments caractéristiques telles leurs glycoprotéines membranaires (*lamps*, *limps*, *lgps*). Il est important de noter que les lysosomes ne possèdent pas les récepteurs du Mannose-6-Phosphate (MPR) cation dépendant et indépendant ce qui les distingue du compartiment endosomal tardif.

Pour assurer la dégradation complète des matériaux aboutissant dans les lysosomes, ceux-ci contiennent un large spectre d'hydrolases acides qui sont généralement des glycoprotéines. Dans les lysosomes, plus de 40 types d'hydrolases



Protomère	Masse (kDa)
B	57
A	~70
C	44
D	30
E	26
a	20
c	16

Figure 1.2 : H⁺/ATPase pompe à protons de la membrane lysosomale. La pompe à protons des lysosomes est une ATPase de classe V. Elle possède un domaine cytoplasmique (V₁) et un domaine transmembranaire (V₀). (Lodish, Baltimore ; Biologie moléculaire de la cellule)

acides catalysent une réaction du type $A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$ et possèdent un pH optimum acide. Le contenu des lysosomes est fortement acide avec un pH de 4.5 à 5.0 (Okhuma and Poole, 1978), ce qui favorise les activités enzymatiques lysosomales mais semble aussi constituer un mécanisme de protection contre une autodigestion de la cellule lors de la libération accidentelle de ces enzymes ; en effet, pour un pH cytosolique plus neutre, les enzymes lysosomales sont moins actives. Parmi les enzymes lysosomales, citons les Cathepsines (exo- et endopeptidases), l'Hexosaminidase et la Phosphatase Acide. Le gradient électrochimique en protons est entretenu activement par une pompe à protons (nous y reviendrons plus tard) ; une H^+ /ATPase de classe V. Contrairement à l'ATPase mitochondriale et aux ATPases de la membrane plasmique, la pompe à protons des lysosomes ne transporte que des ions H^+ sans que ce transport soit couplé au transport d'un autre ion (Mellman *et al.*, 1986). La H^+ /ATPase comporte deux domaines bien séparés ; un domaine hydrophile (V_1) tourné vers le cytoplasme et un domaine transmembranaire (V_0) (fig.1.2). L'acidification de l'organite semble nécessaire à la formation de lysosomes matures (Schmid *et al.*, 1999).

Les hydrolases lysosomales dégradent les macromolécules de provenance intra- et extracellulaire (protéines, polysaccharides, lipides et acides nucléiques) en des molécules de poids moléculaire moins élevé qui peuvent être réutilisées. Les molécules intracellulaires sont transportées à travers la membrane lysosomale (Lloyd, 1996) ou y aboutissent par autophagie. Les lysosomes interviennent dans l'autophagie et sont capables de digérer des organites intracellulaires (p.ex. mitochondries âgées). Les substrats d'origine extracellulaire sont internalisés par endocytose : des bactéries, cellules mortes (p.ex. érythrocytes) et débris cellulaires phagocytés sont éliminés par la voie lysosomale.

1.2.2. Hétérogénéité des lysosomes

Les lysosomes sont des organites difficiles à identifier. Ils sont par nature hétérogènes vu leur mode de biogenèse. Ils sont denses, contiennent des enzymes et protéines membranaires, ne contiennent pas de MPRs ni certaines protéines rab, et ont certainement un contenu varié. Cette variabilité de contenu est inhérente à la biogenèse même des lysosomes à partir du compartiment endosomal/prélysosomal. Le

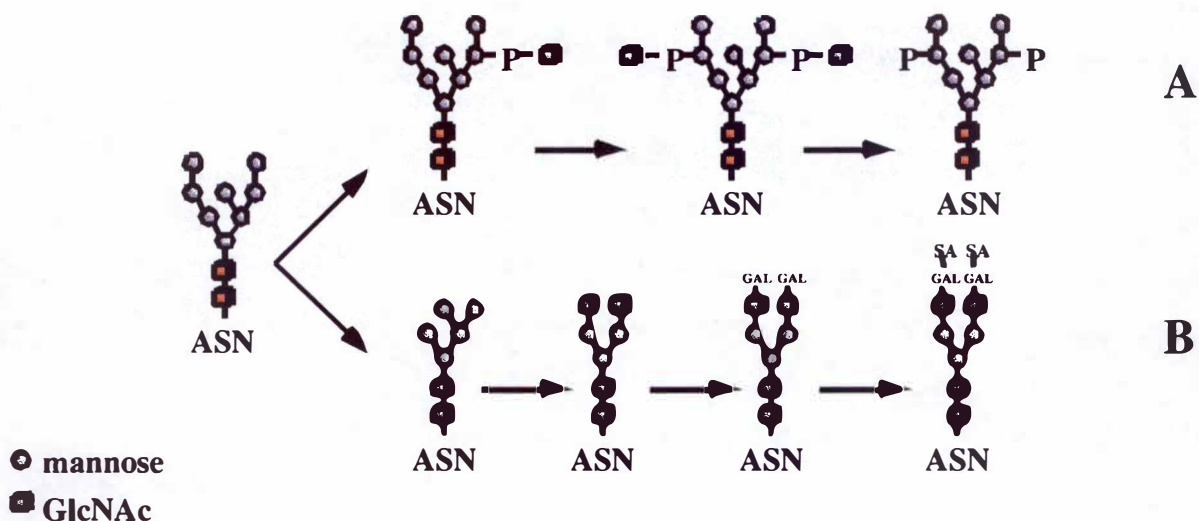


Figure 1.3 : Modification posttraductionnelle des protéines de la voie de la sécrétion. Les hydrolases lysosomales acquièrent un P-GlcNAc dans le RER et un deuxième P-GlcNAc dans le Golgi. Après, les groupes GlcNAc sont retirés dans le Golgi pour donner naissance à des groupes Mannose-6-Phosphate (A). Les protéines sécrétées acquièrent dans le RER des oligosaccharides riche en mannose sur des résidus Asn qui sont convertis, dans le RER et le Golgi, en des oligosaccharides complexes (B). (Pfeffer, 1991).

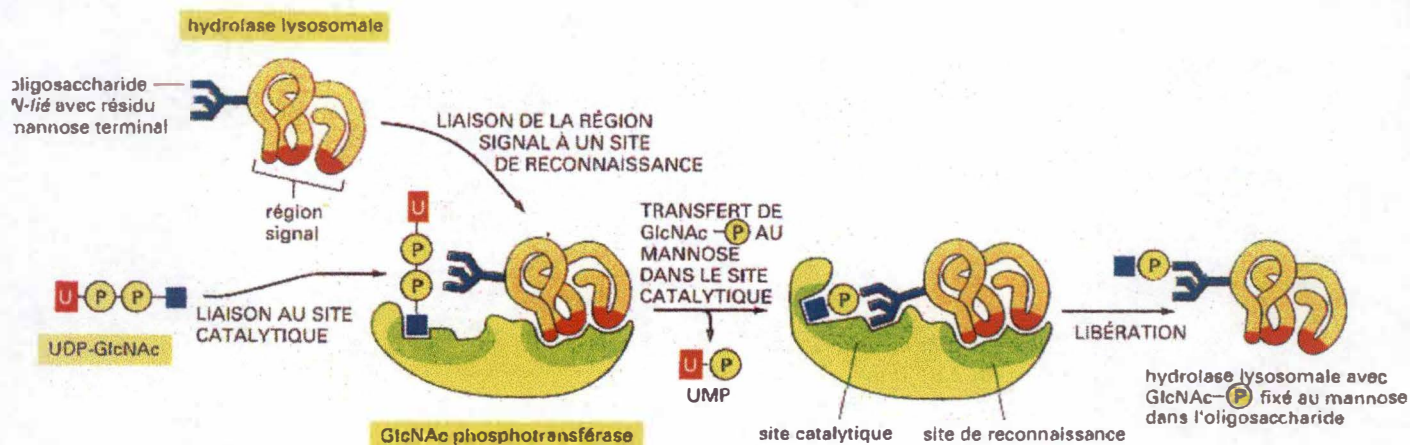


Figure 1.4 : La GlcNAc phosphotransférase reconnaît des domaines spécialisés des hydrolases lysosomales. Cette enzyme ajoute des groupes GlcNAc-P sur des résidus Mannose. (Alberts, Bray ; Biologie moléculaire de la cellule)

compartiment précurseur des lysosomes possède des marqueurs spécifiques notamment les MPRs. Il est le carrefour où débute le processus de dégradation et convergent les voies de la biosynthèse, de l'endocytose et de l'autophagie. Par le fait même, les lysosomes qui en dérivent sont inévitablement hétérogènes puisqu'ils héritent, à partir des endosomes/prélysosomes, des résidus de la biosynthèse, de l'endocytose et de l'autophagie. Les lysosomes apparaissent ainsi comme des corps résiduels remplis de déchets non digestes.

1.3. Biosynthèse des protéines lysosomales

1.3.1. Généralités

1.3.1.1. Biosynthèse des hydrolases solubles des lysosomes

Les enzymes lysosomales solubles dont la synthèse débute sur des ribosomes libres cytosoliques contiennent un peptide-signal qui les dirige vers la lumière du RER, de même que les autres protéines de la voie de la sécrétion (Kornfeld and Mellman, 1989). Les précurseurs des protéines lysosomales subissent un certain nombre de modifications, essentiellement des glycosylations, dans le RER et dans le Golgi. Le ciblage des protéines vers les lysosomes se fait plus précisément via la voie du Mannose-6-Phosphate (M6P) ou une voie indépendante du M6P. Ultérieurement se font le ou les clivages qui produisent l'enzyme mature que l'on retrouve dans les lysosomes.

1.3.1.1.1. *La voie du Mannose-6-Phosphate*

- **La formation du signal M6P**

Dans le RER les protéines lysosomales acquièrent des oligosaccharides riches en mannose fixés sur des résidus *Asn* (**fig.1.3**). Dans l'appareil de Golgi, la N-acétylglucosamine phosphotransférase ajoute des motifs N-acétylglucosamine Phosphate (P-GlcNAc) sur les mannoses des oligosaccharides (von Figura and Hasilik, 1986). La GlcNAc phosphotransférase possède des sites catalytiques et de reconnaissance séparés (**fig.1.4**). Son site catalytique fixe à la fois les oligosaccharides N-liés riches en mannose de la protéine lysosomale et l'UDP-GlcNAc. Son site de

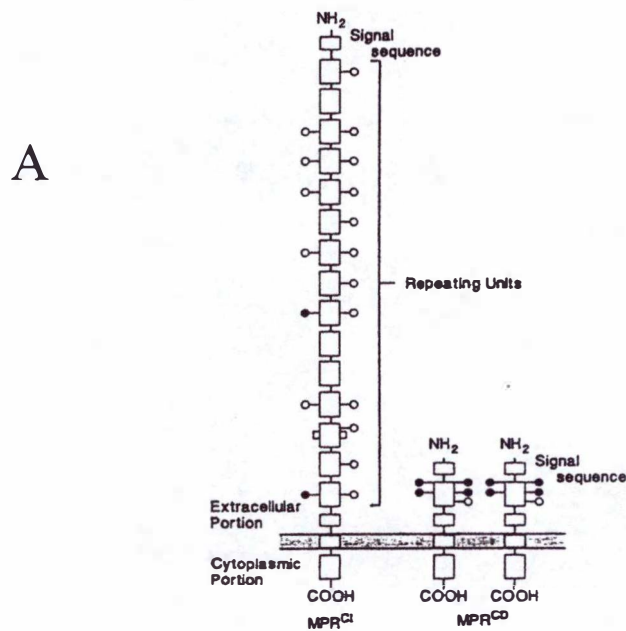


Figure 1.5 : Structures des récepteurs du M6P bovins. MPR indépendant des cations (A). MPR dépendant des cations (B). (Kornfeld and Mellman, 1989)

reconnaissance fixe un domaine spécialisé des enzymes lysosomales, absents dans les autres protéines (Baranski *et al.*, 1990). Selon le nombre d'*Asn* susceptibles d'être modifiés, l'affinité de la GlcNAC phosphotransférase pour les enzymes lysosomales augmente d'un facteur 100 par rapport aux autres protéines. Ensuite, l'enzyme N-acétylglucosaminidase (ou enzyme de "démasquage") retire le GlcNAC pour générer le groupe M6P.

Chaque protéine acquiert plusieurs phosphates (Pfeffer, 1991) ; en effet, chaque protéine lysosomale est susceptible de contenir plusieurs chaînes saccharidiques et cinq des neuf résidus mannose se trouvant sur une chaîne oligosaccharidique sont des sites de phosphorylation potentiels. Les MPRs lient préférentiellement les protéines lysosomales à oligosaccharides biphosphorylés (Munier-Lehmann *et al.*, 1995).

- Les récepteurs du M6P (MPR)

Dans l'appareil de Golgi, les motifs M6P sont reconnus par les récepteurs du Mannose-6-Phosphate (Kornfeld and Mellman, 1989) : soit par le MPR indépendant des cations (CI-MPR) soit par le MPR dépendant des cations (CD-MPR).

Le CI-MPR est une glycoprotéine transmembranaire de 300 kDa dont 20-30 kDa sont dûs à des glucides. Le domaine intraluminal ou extracellulaire (2265 aa) de ce récepteur, site de fixation du substrat, contient 15 unités répétées chacune de 145 acides aminés, interrompues une seule fois par un insert de 43 acides aminés au niveau de la 13^{ème} unité (**fig.1.5**). Le CI-MPR possède deux sites de liaisons pour le M6P et peut donc fixer deux chaînes monophosphorylées, mais il a plus d'affinité pour les oligosaccharides biphosphorylés.

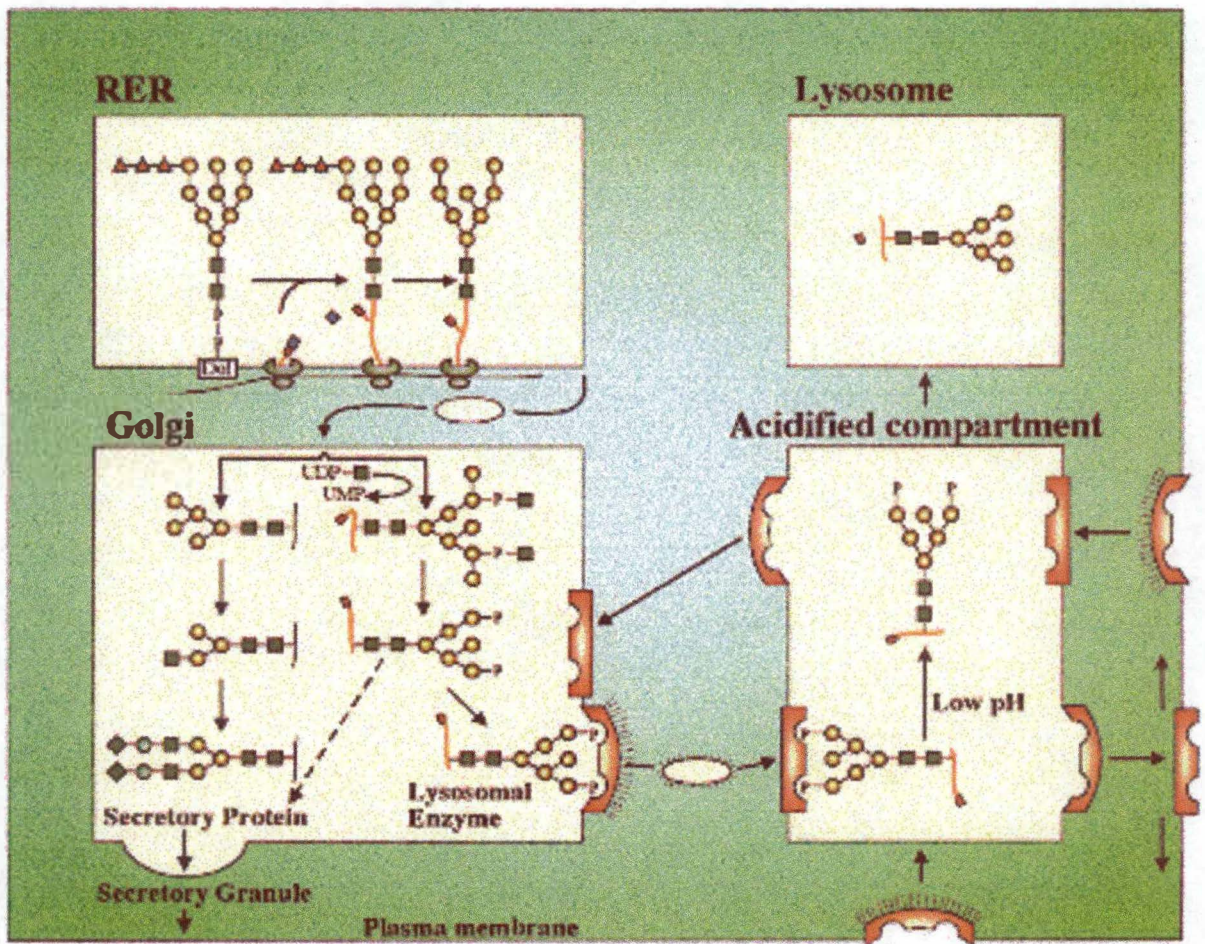
Le CD-MPR est également une glycoprotéine transmembranaire mais d'un poids moléculaire largement inférieur et qui nécessite des cations bivalents pour fixer le M6P. C'est une protéine probablement dimérique dont un protomère a sous sa forme glycosylée une taille d'environ 46 kDa (Hoflack and Kornfeld, 1985) dont ± 18 kDa sont dûs à la glycosylation. Chaque protomère comporte 257 acides aminés, dont 67 constituent le domaine cytoplasmique. Le domaine extracellulaire ou luminal est formé d'une copie simple de la séquence répétée (145 aa) que l'on retrouve 15 fois dans le domaine extracellulaire du CI-MPR. Chaque CD-MPR, sous sa forme dimérique,

contient également deux sites de liaison pour le phosphate et chaque site peut être occupé par une chaîne saccharidique à M6P. Les deux récepteurs possèdent la même affinité pour les oligosaccharides monophosphorylés, mais le CI-MPR fixe les chaînes saccharidiques biphosphorylées avec plus d'affinité que le CD-MPR.

Les MPRs sont localisés majoritairement dans les endosomes tardifs (et les compartiments prélysosomaux) et en quantité mineure à la surface cellulaire (5-10%). Bien que chaque cellule semble posséder les deux types de récepteurs et que les deux récepteurs effectuent la même fonction, on ne connaît pas bien la raison de cette dualité. Tous les deux sont responsables du transport des enzymes marquées par le M6P et tous deux libèrent leur ligand pour un pH inférieur à 5.5 (Hoflack and Kornfeld, 1985) mais seul le CI-MPR participe à l'endocytose des protéines phosphorylées (Kornfeld and Mellman, 1989). Des expériences utilisant des mutants ont montré qu'il semblerait y avoir une différence dans l'affinité avec laquelle les MPRs lient les enzymes lysosomales (Munier-Lehmann *et al.*, 1995). En fonction de l'affinité, on pourrait distinguer trois groupes d'isoformes d'enzymes lysosomales : le premier est préférentiellement lié par le CI-MPR, le deuxième interagit de préférence avec le CD-MPR et le troisième groupe d'isoformes d'enzymes lysosomales est lié avec la même affinité par les deux MPRs. La base moléculaire pour ces interactions différentes serait que le CI-MPR lierait les oligosaccharides biphosphorylés avec plus d'affinité que le CD-MPR. Ceci viendrait du fait que dans le domaine luminal du CI-MPR, les deux sites de liaison pour le M6P seraient très proches l'un de l'autre ce qui favoriserait l'interaction avec les oligosaccharides biphosphorylés. Finalement, la raison de la présence de deux MPRs serait de pouvoir couvrir toutes les modifications posttraductionnelles possibles des enzymes lysosomales dont l'état de phosphorylation peut varier d'un type cellulaire à l'autre.

- Le ciblage des enzymes lysosomales

Après leur formation dans le TGN, les complexes MPR-enzymes lysosomales se rassemblent dans des vésicules qui bourgeonnent à la surface du TGN et transportent les enzymes jusqu'aux endosomes tardifs. La structuration des vésicules se fait par la clathrine qui interagit avec un adaptateur (AP1) reconnaissant le domaine cytoplasmique des MPRs. Dans les endosomes tardifs ou les prélysosomes, les enzymes se dissocient de leur récepteur suite à l'acidité croissante qui règne dans ces



Récepteur du M6P



Vésicule de transport

Figure 1.6 : Représentation schématique du transfert des enzymes lysosomales depuis leur lieu de synthèse dans le réticulum endoplasmique jusqu'aux lysosomes (Kornfeld 1987).

compartiments et rejoignent ensuite les lysosomes (Griffiths *et al.*, 1988). La figure 1.6 résume schématiquement la synthèse et le transport des enzymes lysosomales.

Après avoir relargué leurs ligands dans la lumière d'un compartiment prélysosomal, les deux récepteurs sont recyclés vers le TGN. On ne connaît pas très bien les mécanismes responsables de ce recyclage. Une première possibilité serait une séparation active des MPRs ; les protéines lysosomales resteraient coincées dans une structure précurseur d'une "matrice" intralysosomale (Jadot *et al.*, 1997). Une deuxième possibilité serait une ségrégation active des protéines lysosomales dans des structures vésiculaires contenant les hydrolases solubles et les molécules endocytées ; les MPRs recycleraient passivement vers le TGN ou la membrane plasmique (Ignacio *et al.*, 1994).

Le CI-MPR présent à la surface cellulaire peut se lier à des enzymes lysosomales sécrétées par défaut se trouvant dans le milieu extracellulaire pour les délivrer aux endosomes, ce qui constituerait une deuxième voie de transport du M6P des hydrolases lysosomales. Puisqu'on trouve aussi des récepteurs au niveau de la membrane plasmique, il n'est pas exclu que le retour des récepteurs vers le TGN se fasse aussi via la membrane cellulaire (Pfeffer 1991).

Un problème qui reste est de savoir comment se fait dans le TGN la ségrégation des MPRs et des autres protéines membranaires. Lobel *et al.* (1989) ont utilisé des mutants du 300 kDa-CI-MPR. Leurs résultats montrent que les MPRs possèdent dans leur domaine cytosolique un motif **Leu-Leu** C-terminal qui les dirige à partir du TGN vers les prélysosomes. En plus, la ségrégation des MPRs au départ du TGN pourrait nécessiter l'intervention d'une phosphorylation car le motif **Leu-Leu** se trouve à côté d'un site de phosphorylation par une caséine kinase. (Ignacio *et al.*, 1994). Un autre motif important que l'on retrouve dans le domaine cytoplasmique des MPRs est un résidu **tyrosine** retrouvé aussi chez des protéines lysosomales membranaires. Il semble que ce résidu joue un rôle important dans l'endocytose des MPRs (Jadot *et al.*, 1992).

- Importance du ciblage par le signal M6P

Il est clair que la voie du M6P est très importante pour le ciblage des protéines lysosomales : en effet l'absence du signal M6P entraîne une sécrétion de la quasi-

totalité des enzymes lysosomales. Cet état pathologique s'observe notamment dans le cas de deux maladies caractérisées par une déficience en enzymes lysosomales ; la mucopolidose II (M-II, "I-cell disease") qui est présente aussi sous une forme plus bénigne, la mucopolidose III (M-III, "pseudo-Hurler polydystrophy") (Kornfeld and Mellman 1989). Des patients atteints de cette maladie présentent une déficience en GlcNAG phosphotransférase ; déficience complète dans le cas de la M-II et partielle dans le cas de la M-III.

1.3.1.1.2. La voie indépendante du Mannose-6-Phosphate

Bien qu'on connaisse aujourd'hui la cause de la M-II et de la M-III, il reste un point obscur ; dans une telle maladie, certains types cellulaires ne sont pas déficients en enzymes lysosomales. En effet, lors de la "I-cell disease" certains organes présentent un taux normal en enzymes lysosomales. Cette constatation est une première indication qu'il doit exister une autre voie de ciblage des hydrolases acides vers les lysosomes. Il existe des indications que certaines enzymes lysosomales (Glucocérébrosidase, Cathepsine D et la protéine activant les sphingolipides (SAP)) peuvent s'associer indépendamment du M6P aux membranes pour être ciblées vers les compartiments lysosomaux (Rijnboutt *et al.*, 1991). Les expériences suivantes viennent étayer cette affirmation. Des cellules HepG2 sont perméabilisées à la saponine qui, en complexant du cholestérol, perturbe l'intégrité de la membrane cellulaire et des endomembranes. Les cellules ainsi traitées sont mises ensuite en présence de M6P 10 mM, en vue de déplacer les protéines associées à une membrane par le récepteur du M6P. Dans de telles conditions, 50 % de la Cathepsine D reste dans les cellules. Ceci est un deuxième argument pour un ciblage des enzymes lysosomales indépendant du M6P. Un mécanisme possible serait leur agrégation au niveau du RER et l'association des agrégats ainsi formés avec la membrane au niveau du TGN (Jadot *et al.*, 1997 ; Zhu and Conner 1994). On ne connaît pas encore les mécanismes responsables de ces agrégations et associations membranaires, mais il n'est pas exclu que des interactions hydrophobes pourraient intervenir puisque l'agrégation semble apparaître quand les enzymes lysosomales se trouvent proches de leur point isoélectrique (Needleman and Koenig, 1974). En plus, le séquençage de la glucocérébrosidase a montré l'existence de domaines hydrophobes qui pourraient former des ancrages membranaires (Rijnboutt *et al.*, 1991).

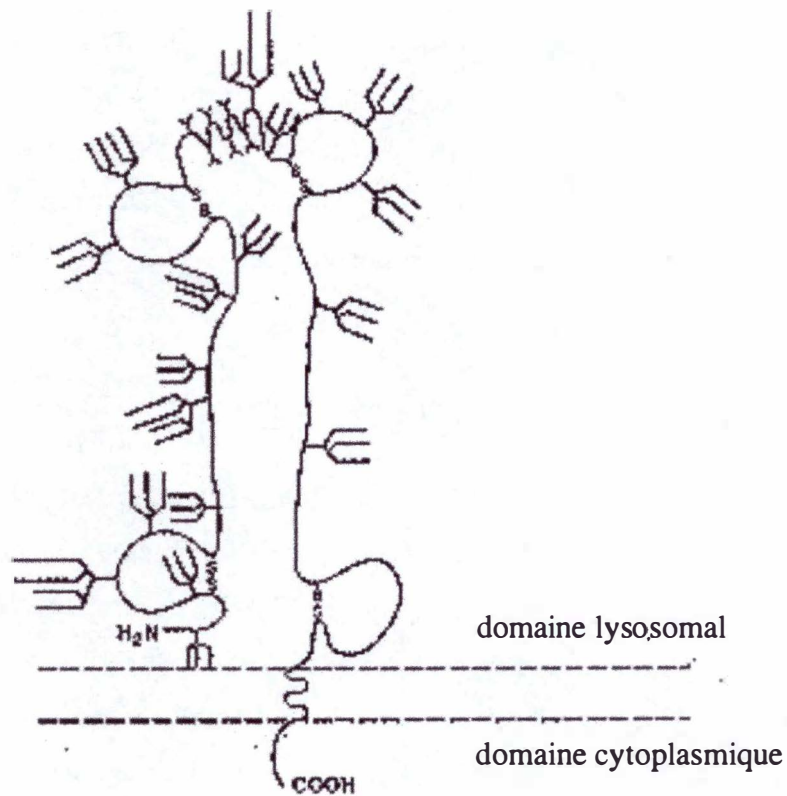


Figure 1.7 : Structure de *lamp-1*. La majeure partie de la protéine se trouve dans la lumière lysosomale. La structure de *lamp-2* est presque identique (Fukuda, 1994).

Ψ Glucides N-liés

Y Glucides O-liés

1.3.1.2. Biosynthèse des protéines membranaires des lysosomes

1.3.1.2.1. Les glycoprotéines membranaires

Les protéines membranaires des lysosomes sont presque toutes des glycoprotéines identifiées par des AC mono- et polyclonaux produits contre des lysosomes purifiés. Elles se composent principalement de deux groupes : *lamp-1* et *lamp-2* (Kornfeld and Mellman, 1989). Ces deux familles de glycoprotéines lysosomales (*lamp-1* et *lamp-2*), ont un poids moléculaire de 100-120 kDa et ont été identifiées dans les lysosomes humains, mais aussi chez d'autres espèces (souris, rat et poulet). La partie polypeptidique ne rend compte que de ± 35 % du poids moléculaire (± 40 kDa), ce qui prouve que la partie glucidique doit jouer un rôle important dans les fonctions des *lamps* (Fukuda, 1994). La majeure partie de ces protéines se trouve dans la lumière lysosomale tandis que les régions transmembranaires et cytosoliques sont relativement réduites (fig.1.7). La partie intralysosomale des *lamps* humains comprend 349 acides aminés. Bien que *lamp-1* et *lamp-2*, au sein d'une même espèce, soient homologues et possèdent une organisation structurale similaire, il s'agit cependant de deux glycoprotéines immunologiquement distinctes. Néanmoins, on suppose que *lamp-1* et *lamp-2* dérivent d'un même gène ancestral qui s'est dupliqué très tôt dans l'évolution. Cependant les protéines *lamp-1* possèdent beaucoup de ressemblance entre elles, d'une espèce à l'autre, et bien plus même qu'avec *lamp-2* d'une même espèce. *Lamp-1* humain est plus apparenté à *lamp-1* de poulet (51.5 % d'identité) qu'à *lamp-2* humain (36.7 %). Cette même constatation a été faite pour *lamp-2* qui a plus d'identité avec les *lamp-2* d'autres espèces qu'avec *lamp-1* de la même espèce.

Deux autres groupes de protéines lysosomales membranaires majeures sont *limp-1* et *limp-11*, glycoprotéines d'une taille inférieure aux *lamps*. *Limp-1* comporte 238 acides aminés, mais son poids moléculaire peut varier de 30 à 50 kDa (Metzelaar *et al.*, 1991) ce qui indique une importance variable de la partie glucidique. Il y a sur la partie luminale trois sites de N-glycosylation qui sont utilisés mais peuvent subir des glycosylations variables. La molécule possède trois domaines transmembranaires composés de résidus hydrophobes. *Limp-11* est composé de 477 ou 478 acides aminés et possède un poids moléculaire variable entre 74 et 85 kDa. Le fait que la chaîne peptidique ne rende pas compte à elle seule du poids moléculaire de *limp-11* indique à

nouveau l'importance de la partie glucidique ; *limp-11* possède onze sites potentiels de N-glycosylation.

1.3.1.2.2. Fonctions des glycoprotéines lysosomales membranaires

Les fonctions des *lamps* et des *limps* sont largement inconnues, mais leur présence abondante et le fait qu'une partie importante de leur séquence est conservée suggèrent qu'elles doivent jouer un rôle critique dans la fonction lysosomale (Kornfeld and Mellman, 1989).

- Rôles dans la fusion et le transport

On peut imaginer que les glycoprotéines membranaires interviennent dans la fusion des lysosomes avec d'autres organites comme les endosomes, les phagosomes mais aussi avec la membrane cellulaire puisque les lysosomes peuvent sécréter leur contenu dans le milieu extracellulaire (Stinchcombe and Griffiths, 1999). Un autre rôle important des glycoprotéines qui découle de la fonction lysosomale serait celui de transporteur. Pour importer les protéines cytosoliques dépliées destinées à la dégradation et pour exporter les molécules issues du métabolisme dégradatif, les lysosomes doivent disposer de transporteurs appropriés (Lloyd, 1996 ; Salvador *et al.*, 2000). La glycoprotéine LGP96 (*lamp-2*) a été reconnue comme étant un récepteur et transporteur spécifique de certains substrats importés dans les lysosomes (Cuervo and Dice, 1996). Il est intéressant de noter que parmi les transports effectués par ces glycoprotéines membranaires doivent figurer des transports ioniques équilibrant le pompage de protons par la H^+ /ATPase. Le fait que la pompe à protons lysosomale ne transporte que des ions H^+ nécessite le déplacement en sens opposé d'une charge équivalente en cations ou bien le déplacement dans le même sens d'une charge équivalente en anions.

- Rôle protecteur

Les glycoprotéines membranaires séparent le contenu enzymatique des lysosomes du reste de la cellule ce qui implique que les protéines lysosomales membranaires doivent résister à la dégradation enzymatique par les hydrolases lysosomales. La présence importante des *lamps* évoque l'idée que ces molécules forment un tapis

continu à la surface interne des lysosomes (Granger *et al.*, 1990) intervenant dans la création d'une barrière protectrice contre les hydrolases.

- Importance de la glycosylation

Dans cette optique, une autre question intéressante serait de connaître la signification de la glycosylation importante des protéines lysosomales membranaires ; dans beaucoup de cellules, les *lamps* sont les porteurs majeurs de poly-N-acétyllactosamine. Le fait que le temps de demi-vie des *lamps* diminue considérablement si ces molécules sont synthétisées en présence de tunicamycine, un inhibiteur de la N-glycosylation (Barriocanal *et al.*, 1986), indique que la composante glucidique doit jouer un rôle important. En plus de leur rôle protecteur, les glucides des *lamps* pourraient assurer la stabilité des membranes lysosomales. L'enrichissement en poly-N-acétyllactosamine des glycoprotéines lysosomales est encore plus marqué dans les cellules tumorales (Yamashita *et al.*, 1984) et des expériences, utilisant la tunicamycine, ont montré que le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses semble lié au taux de poly-N-acétyllactosamine. Les cellules cancéreuses expriment également plus de *lamps* à la surface cellulaire que les cellules normales (Saitoh *et al.*, 1992 ; Sarafian *et al.*, 1998) et les *lamps* de cellules cancéreuses sont plus riches en glucides (Hoff *et al.*, 1989).

1.3.1.2.3. Ciblage des glycoprotéines lysosomales membranaires

Les glycoprotéines membranaires des lysosomes sont synthétisées dans le RER où elles s'insèrent dans la membrane. On peut imaginer deux voies possibles pour cibler ces protéines membranaires vers les lysosomes ; un ciblage direct à partir du TGN et un transport passant par la membrane plasmique suivi d'endocytose (Kornfeld and Mellman, 1989). Comme pour les MPRs, l'information dirigeant les protéines membranaires vers les lysosomes est contenu dans le domaine cytoplasmique. La comparaison des séquences de *lamp-1* et *lamp-2* a montré que le motif **His-Ala-Gly-Tyr** (HAGY) est présent dans le domaine cytoplasmique de ces deux molécules. Des expériences ultérieures ont montré que c'est précisément le résidu **tyrosine** qui serait essentiel au ciblage de ces protéines membranaires vers les lysosomes. En changeant la position relative du résidu **tyrosine**, on peut inhiber le transport des *lamps* vers les lysosomes (Williams and Fukuda, 1990). La figure 1.8 compare les séquences de

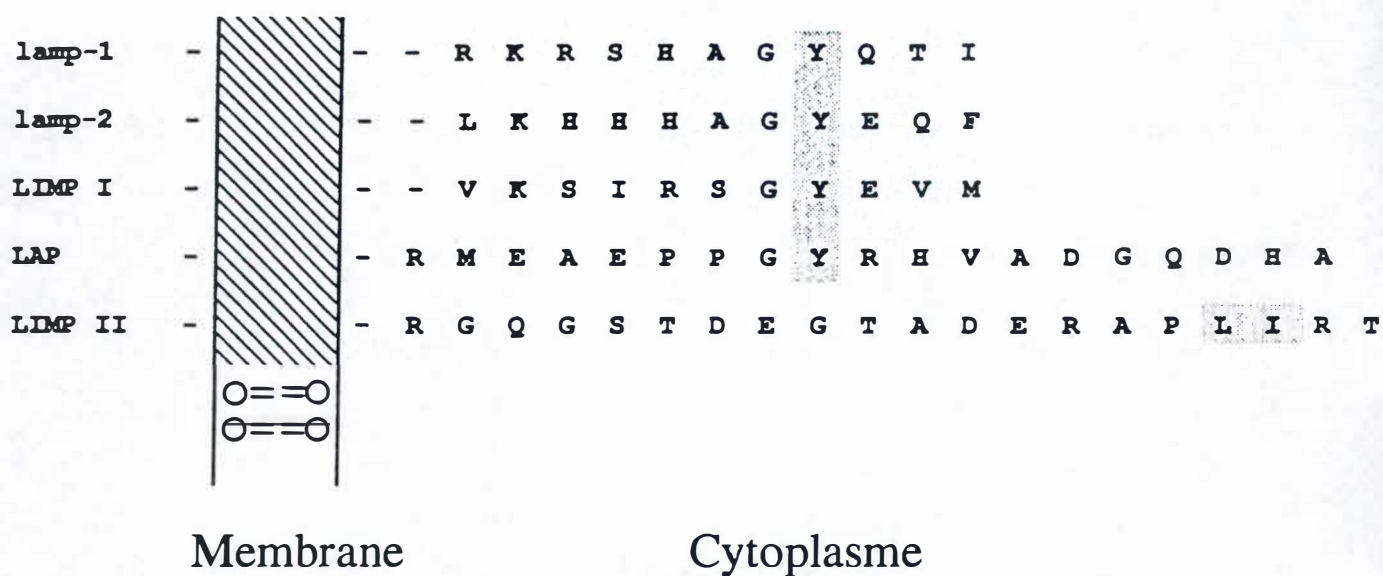


Figure 1.8 : Comparaison des séquences cytoplasmiques de glycoprotéines lysosomales membranaires (Fukuda, 1994).

LAP : Phosphatase Acide Lysosomale

quatre glycoprotéines majeures des lysosomes. On constate que *lamp-1*, *lamp-2* et *limp-1* possèdent un motif *glycine-tyrosine* à la même position. Il faut noter que la séquence nécessaire au ciblage contenant le motif *glycine-tyrosine* adopte une configuration de coude β que l'on retrouve également chez d'autres protéines internalisées (récepteur à la transferrine). Ainsi un changement de la position du résidu *tyrosine* empêcherait la reconnaissance du domaine cytosolique des protéines membranaires par les protéines adaptatrices (AP2) et la formation de vésicules d'endocytose tapissées de clathrine (Ignacio *et al.*, 1994). Ces résultats montrent que les protéines membranaires sont ciblées vers les lysosomes en transitant par la membrane plasmique bien que *lamp-1* emprunte également une voie directe à partir du TGN vers les organites prélysosomaux.

La figure 1.8 montre aussi la séquence du domaine cytoplasmique de la Phosphatase Acide lysosomale (LAP) ; c'est une enzyme soluble synthétisée sous forme d'un précurseur transmembranaire transporté vers les lysosomes denses où s'effectue le clivage protéolytique qui mène à la forme mature soluble. Le domaine cytosolique de la Phosphatase Acide contient également un motif *glycine-tyrosine* à la même position que *lamp-1*, *lamp-2* et *limp-1*. On a pu montrer qu'une substitution du résidu tyrosine par une phénylalanine entraîne l'accumulation de la Phosphatase Acide à la membrane cellulaire (Kornfeld and Mellman, 1989). Ceci montre à nouveau l'importance de ce motif dans le processus de ciblage des protéines membranaires vers les lysosomes. La forme précurseur transmembranaire de la Phosphatase Acide est d'abord transportée vers la membrane plasmique d'où elle est rapidement internalisée pour être transportée vers les lysosomes (Braun *et al.*, 1989 ; Ignacio *et al.*, 1994).

La figure 1.8 décrit en plus le domaine cytoplasmique de *limp-II*. On constate que *limp-II* ne contient pas le motif *glycine-tyrosine* retrouvé chez les autres protéines membranaires des lysosomes. Ceci indique que *limp-II* doit contenir une séquence en acides aminés différente qui la dirige vers les lysosomes. Lorsqu'on élimine progressivement l'acide aminé en position C-terminale (Ogata and Fukuda, 1993), il apparaît que les trois à quatre derniers acides aminés semblent nécessaires au ciblage de *limp-II* et plus précisément le motif *leucine-isoleucine*. Ce motif *leucine-isoleucine* de *limp-II* ressemble d'ailleurs au motif *leucine-leucine* nécessaire au ciblage du CI-MPR. Cette ressemblance indique que *limp-II* utilise probablement le même

mécanisme de ciblage que le CI-MPR à savoir un transport direct à partir du TGN vers les compartiments prélysosomaux. On ne connaît pas bien les mécanismes moléculaires qui sont à la base de la ségrégation des glycoprotéines lysosomales, mais il est possible que des adaptateurs comme AP1 et AP3 soient impliqués (Mullins and Bonifacino, 2001).

Quoique les glycoprotéines lysosomales membranaires se retrouvent majoritairement dans les compartiments prélysosomaux et les lysosomes, on peut les localiser également au niveau de la membrane plasmique. *Lamp-1* et *lamp-2* sont exprimées à la surface cellulaire de plaquettes activées (Febbraio and Silverstein, 1990). Dans le cas de lymphocytes T cytotoxiques ayant exocyté les hydrolases contenues dans les granules de sécrétion, les glycoprotéines membranaires de ces derniers pourraient, par leur composante glucidique, protéger les lymphocytes contre une dégradation par leurs propres hydrolases.

1.3.2. Biosynthèse de la Cathepsine D

La Cathepsine D est une endopeptidase lysosomale à aspartate apparentée à d'autres protéases à aspartate non-lysosomales comme la rénine et la pepsine (Richo and Conner, 1994). Elle est synthétisée avec un peptide-signal amino-terminal d'une longueur de 20 acides aminés similaire à celui des protéines sécrétées et qui dirige la translocation de l'enzyme à travers le RER. Le clivage co-translationnel du peptide-signal se fait dans le RER par des signal-peptidases (Erickson, 1989). La Cathepsine D contient également un propeptide amino-terminal contrôlant l'activité enzymatique et la stabilité et dont le clivage protéolytique entraîne l'activation de l'enzyme (Richo and Conner, 1994). Dans la lumière du RER, la proenzyme acquiert deux chaînes oligosaccharidiques fixées sur deux *Asn*. Dans l'appareil de Golgi, les chaînes glucidiques sont modifiées ; il peut y avoir phosphorylation ou transformation en un oligosaccharide plus complexe (Gieselmann *et al.*, 1983). Cette forme de la Cathepsine D constitue la forme précurseur, on parle de Procathepsine D ayant un poids moléculaire de **53 kDa** (tab.1.1). Le ciblage de la Cathepsine D vers les lysosomes se fait suite à l'interaction des résidus Mannose-6-Phosphate (M6P) avec les récepteurs du M6P (MPRs). Le ciblage pourrait se faire également par une voie indépendante du M6P (Rijnboutt *et al.*, 1991 ; Capony *et al.*, 1994). Lors de son trajet vers les

lysosomes, la Cathepsine D passe par des compartiments prélysosomaux où l'enzyme se dissocie du récepteur suite à l'acidité croissante qui règne dans ces organites et où un clivage protéolytique transforme le précurseur en une forme intermédiaire (Pseudocathepsine D) ayant un poids moléculaire de **47 kDa** et douée d'activité enzymatique (**fig.1.9**). Un deuxième clivage protéolytique aboutit à la Cathepsine D mature qui comporte une chaîne lourde (**31 kDa**) et une chaîne légère (**13-14 kDa**). Lors du clivage de la forme intermédiaire en forme mature, la Cathepsine D perd sept acides aminés entre les chaînes lourde et légère (Faust *et al.*, 1985). Tardivement la Cathepsine D subit un processing qui provoque la perte de deux acides aminés C-terminaux (Erickson, 1989). La raison de cette modification tardive n'est pas connue, mais une explication serait une intervention dans le "turnover" de l'hydrolase.

On ne connaît pas bien les *enzymes protéolytiques* impliquées dans le processing de la Cathepsine D. Cependant on sait que la Cathepsine D est capable de s'autocliner en Pseudocathepsine D *in vitro* mais que le deuxième clivage ne peut pas se faire par autocatalyse, ce qui implique l'intervention d'une autre protéase (Richo and Conner, 1994). Des expériences de maturation *in vitro* suggèrent que la deuxième étape de maturation nécessite l'intervention de protéases à cystéine (Gieselmann *et al.*, 1985). De même, on ne connaît pas exactement le *compartiment subcellulaire* impliqué dans la deuxième étape de maturation de la Cathepsine D, mais il semblerait que dans les cellules HepG2, le deuxième clivage protéolytique se ferait dans les lysosomes (Rijnboutt *et al.*, 1992 ; Delbrück *et al.*, 1994).

Dans des fibroblastes humains, de 5 à 15 % du précurseur de la Cathepsine D sont sécrétés dans le milieu extracellulaire (Gieselmann *et al.*, 1985). Dans les cellules cancéreuses cette proportion est plus élevée : plus de 50 % de Procathepsine D pour les cellules HepG2 (Delbrück *et al.*, 1994). Il se pourrait que la Procathepsine D sécrétée par les cellules cancéreuses subisse une autoactivation extracellulaire en Pseudocathepsine D douée d'activité enzymatique ; ceci permettrait aux cellules cancéreuses de dégrader la matrice extracellulaire afin de s'échapper à travers la membrane basale (Rochefort *et al.*, 1987). Par ailleurs l'enzyme sécrétée peut être endocytée par la même cellule par un récepteur du M6P se trouvant à la surface cellulaire, mais il n'est pas exclu que l'endocytose de la Procathepsine D se fasse également par une voie indépendante du M6P (Matha *et al.*, 1998). En effet, on a pu

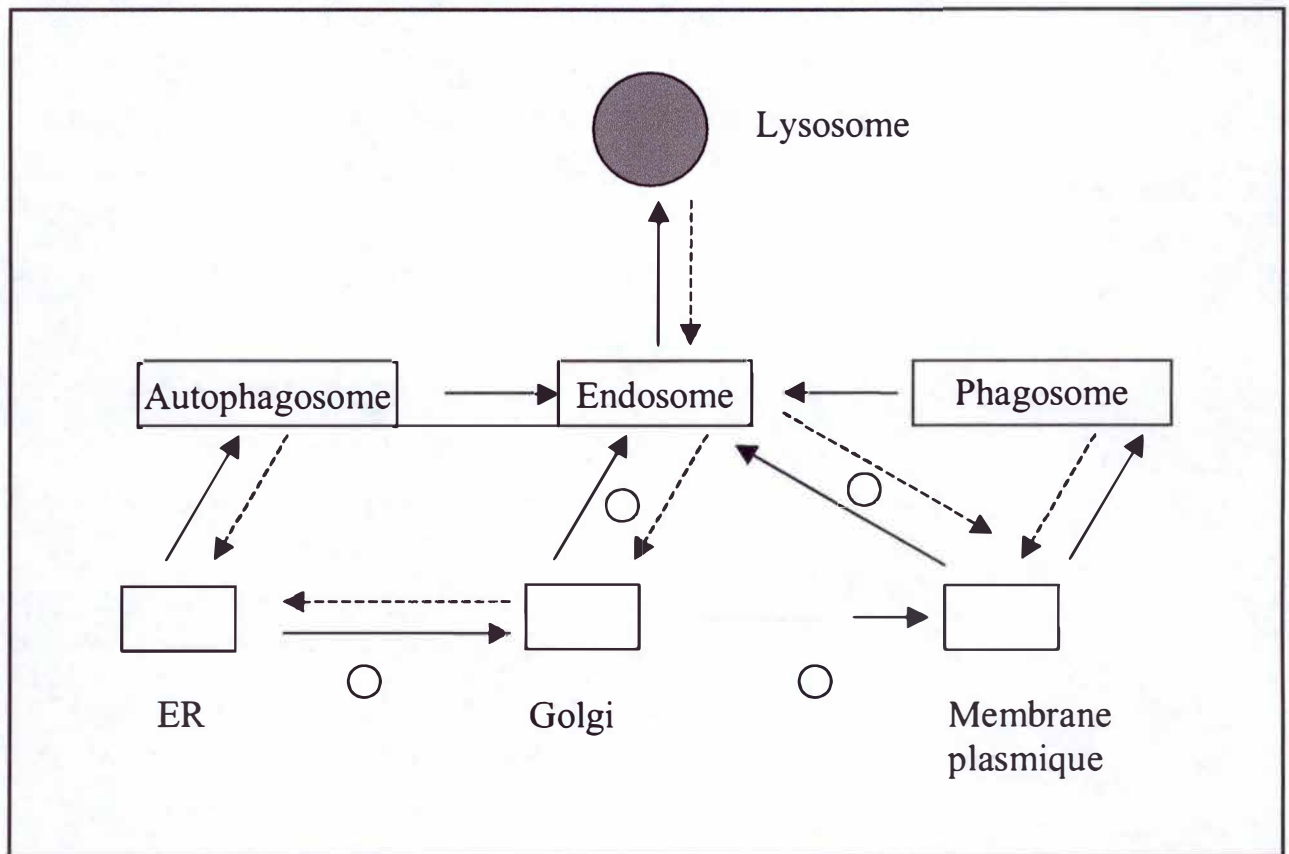


Figure 1.10 : Relations entre les lysosomes et les autres organites du trafic membranaire. Les lysosomes sont en relation avec la voie biosynthétique, endocytaire, phagocytaire et autophagique (Storrie and Desjardins, 1996).

- Vésicule de transport
- Transport antérograde
- ← Transport rétrograde

montrer que la Procathepsine D est endocytée en présence de M6P 10 mM, ce qui déplace la proenzyme du MPR se trouvant à la membrane cellulaire. Ceci évoque une endocytose indépendante du M6P.

1.4. Biogenèse des lysosomes denses ("dense core lysosomes")

1.4.1. Généralités

Il faut noter que la biogenèse des lysosomes au sens large implique non seulement le ciblage des protéines lysosomales solubles et membranaires à partir du TGN et de la membrane plasmique, mais aussi le transport du matériel endocyté destiné à la dégradation (**fig.1.10**). Le point clé de la biogenèse des lysosomes denses est de savoir comment se fait le transport à partir des endosomes tardifs du matériel destiné aux lysosomes. C'est dans les endosomes précoces que les molécules endocytées via un récepteur, c'est-à-dire les ligands, se détachent de leur récepteur et sont transportées vers les endosomes tardifs et ensuite vers les lysosomes, tandis que les récepteurs recyclent vers la membrane cellulaire (Mellman, 1996). On connaît assez bien les voies de transport qui mènent vers les endosomes tardifs, par contre, ce qui est moins bien connu, c'est la biogenèse des "dense core lysosomes" à partir des endosomes tardifs. On peut différencier nettement les endosomes tardifs des lysosomes denses ; les premiers sont des organites hétérogènes dont beaucoup contiennent des vésicules internes ("MVB", Hopkins *et al.*, 1990), tandis que les seconds se présentent dans les cellules de mammifères comme étant des structures denses aux électrons en microscopie électronique (Novikoff, 1959).

La première hypothèse expliquant la biogenèse des lysosomes a été établie autour des années soixante (de Duve and Wattiaux, 1966). Cette théorie envisageait, par analogie avec la formation des granules de sécrétion, la formation des lysosomes directement à partir du Golgi, et plus précisément à partir du TGN, sans passer par le système endosomal. Ces lysosomes néoformés (lysosomes primaires) fusionneraient avec des endosomes ou des phagosomes pour devenir des endolysosomes ou des phagolysosomes au sein desquels s'effectuerait la dégradation enzymatique (lysosomes secondaires). Actuellement il existe quatre modèles pour expliquer la biogenèse des "dense core lysosomes" (Storrie and Desjardins, 1996 ; Luzio *et al.*, 2000 ; Mullins and

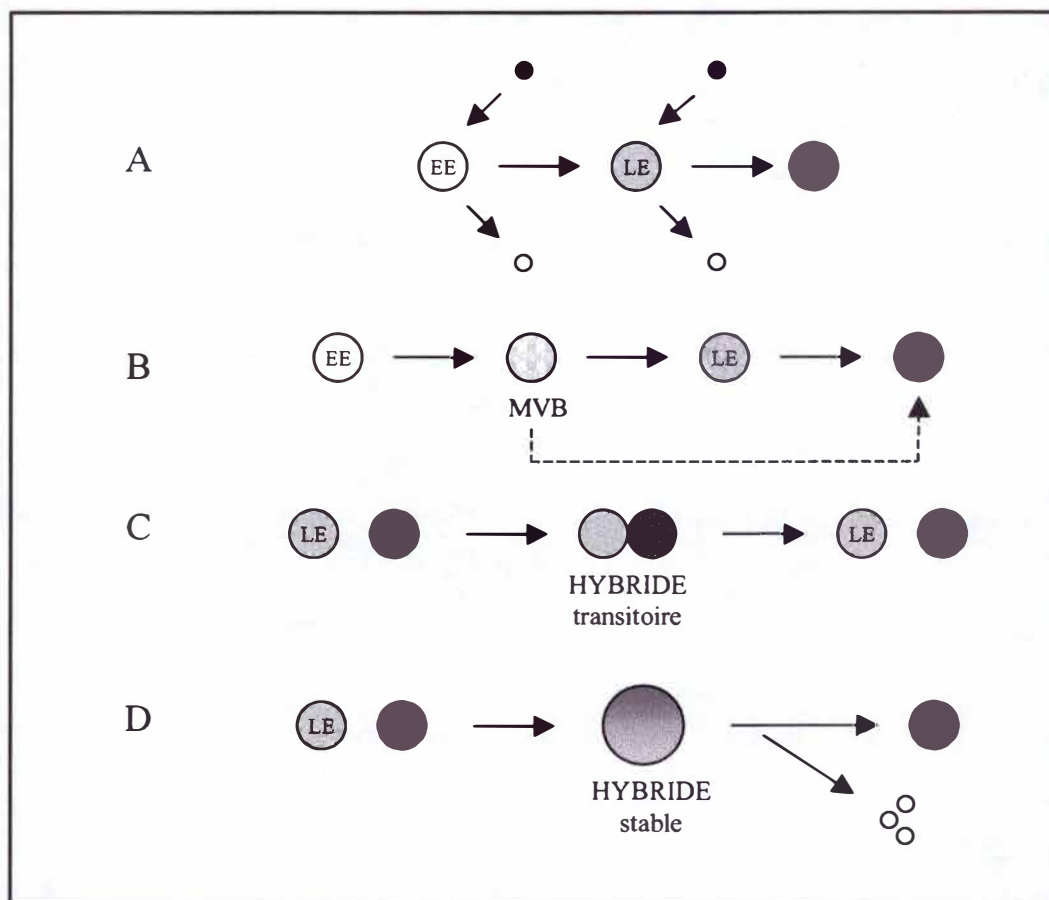


Figure 1.11 : Biogenèse des lysosomes denses selon 4 modèles. (A) Modèle de la maturation. (B) Modèle du transport vésiculaire. (C) Modèle de l'hybride transitoire. (D) Modèle de l'hybride stable. (Mullins and Bonifacino, 2001)

- ⊖ EE Endosome précoce
- ⊖ LE Endosome tardif
- Lysosome
- Vésicule de transport
- Vésicule de recyclage
- MVB Corps multivésiculaire

Bonifacino, 2001) : la maturation des endosomes tardifs, le transport vésiculaire et la formation d'un organite intermédiaire selon deux schémas différents (**fig.1.11**). Ces quatre modèles rendent compte de la voie biosynthétique menant aux lysosomes (enzymes solubles et membranaires) et permettent d'expliquer comment le matériel endocyté, phagocyté ou autophagocyté est transporté vers les lysosomes pour y subir la dégradation.

1.4.1.1. Modèle de la maturation ("Maturation Model")

D'après ce modèle, les endosomes tardifs ou les compartiments prélysosomaux se transforment progressivement, par ajout de vésicules dérivées du TGN, en lysosomes denses contenant le matériel en cours de dégradation. Ceci implique que lors du processus tout le matériel non-lysosomal est recyclé à partir de l'organite en cours de maturation. Bien que des expériences *in vitro*, au cours desquelles on a incubé des endosomes avec un extrait cytosolique et de l'ATP, ont pu mettre en évidence un accroissement de la densité des endosomes, cette augmentation de densité n'est pas suffisante pour rendre compte de la formation des lysosomes denses (Mullock *et al.*, 1994). Le modèle de la maturation peut être vu comme une extension du modèle originel suggérant que la biogenèse des lysosomes se fait par néoformation (de Duve and Wattiaux, 1966)

1.4.1.2. Modèle du transport vésiculaire ("Vesicle Shuttle Model")

Par analogie avec les autres étapes du trafic membranaire, on peut imaginer que le transport du matériel biosynthétique et endocyté se fasse par des vésicules de transport qui bourgeonnent des endosomes tardifs et fusionnent avec les lysosomes préexistants. Dans ce modèle, les endosomes et les lysosomes forment des compartiments stables et bien distincts. Au niveau moléculaire ce transport fait intervenir des molécules v-Snare et t-Snare (récepteurs pour les protéines d'attachement), des protéines Rab (protéines liant le GTP) et peut-être d'autres protéines d'interaction. Évidemment ce type de transport implique aussi un transport rétrograde responsable du maintien de l'équilibre dynamique dans lequel se trouvent les membranes biologiques. Néanmoins, bien qu'il existe un transport rétrograde, ceci n'exclut pas que les lysosomes, en augmentant leur surface membranaire, peuvent croître et se diviser par fission.

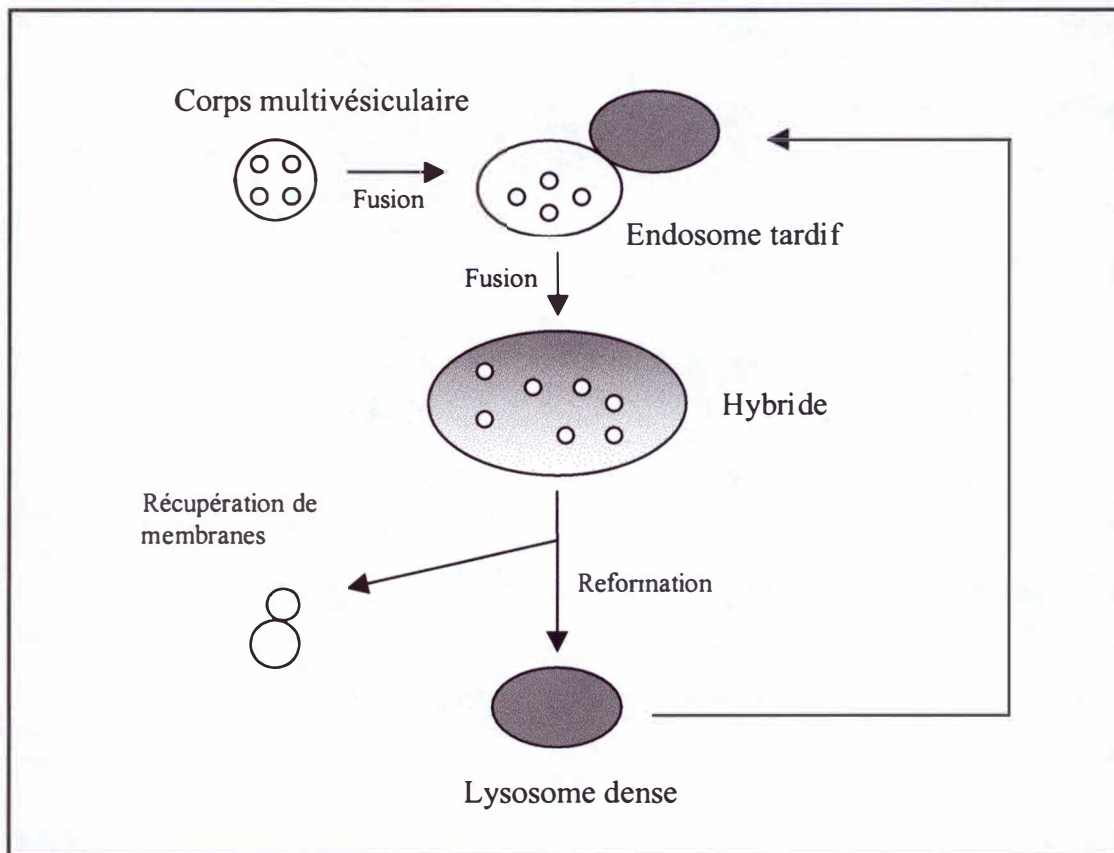


Figure 1.12 : Reformation des lysosomes denses à partir de l'organe intermédiaire stable. Les lysosomes denses se forment par condensation du contenu de l'hybride et recyclage des membranes. Les lysosomes reformés peuvent être réutilisés (Bright *et al.*, 1997).

1.4.1.3. Modèles de l'organite hybride ("Kiss and Run Model" et "Fusion-Fission Model")

Une troisième hypothèse qui permet d'expliquer la biogenèse des lysosomes denses est basé sur l'observation qu'il peut y avoir un mélange entre le contenu et les membranes des endosomes et des lysosomes (Storrie and Desjardins, 1996 ; Mullock, 1998). Selon cette théorie, des répétitions de fusions transitoires entre ces deux compartiments formeraient un organite intermédiaire transitoire (Storrie and Desjardins, 1996 ; Luzio *et al.*, 2000). Une extension de cette dernière théorie suggère que les endosomes fusionnent complètement avec les lysosomes pour former un organite hybride plus stable (**fig.1.12** ; Griffiths 1996 ; Bright *et al.*, 1997).

Ces deux derniers modèles ont en commun le fait que les endosomes tardifs fusionnent avec des lysosomes préexistants et que les lysosomes denses, contenant le matériel dégradé ou en cours de dégradation, se reforment à partir du compartiment intermédiaire par condensation du contenu lysosomal (Bright *et al.*, 1997). Ces deux modèles défendent donc une perspective selon laquelle les lysosomes constituent un réservoir en hydrolases acides qui se déversent dans les endosomes tardifs pour provoquer la dégradation (Tjelle *et al.*, 1996). On peut remarquer qu'à tout moment, 15% des lysosomes seraient fusionnés avec des endosomes tardifs (Luzio *et al.*, 2000).

Ces deux modèles sont également en accord avec plusieurs faits généralement énoncés en relation avec les lysosomes (Storrie and Desjardins 1996) :

- Les lysosomes sont morphologiquement et biochimiquement distincts des autres compartiments du trafic intracellulaire ; ils sont plus denses que les endosomes tardifs et ne contiennent pas les marqueurs qu'on retrouve dans les endosomes tardifs comme le récepteur au Mannose-6-Phosphate (MPR) et la protéine Rab7.
- Les lysosomes peuvent accueillir du matériel endocyté et ce, même s'ils sont gonflés par accumulation du saccharose ("sucrosomes").
- Les lysosomes constituent un compartiment dynamique ; une molécule non dégradable, tel le saccharose, ressort des lysosomes et est exocytée.
- Le trafic vers ou à partir des lysosomes est un processus qui dépend des microtubules, donc du cytosquelette. Ceci a été mis en évidence par l'utilisation du nocodazole, une drogue qui entraîne la dépolymérisation des microtubules (Jahraus *et al.*, 1994).

1.4.2. Les "sucrosomes"

Le saccharose est endocyté par endocytose fluide par les cellules et s'accumule dans les endosomes tardifs ou dans les lysosomes. Cette accumulation crée un appel d'eau faisant gonfler ces compartiments qui se transforment en "sucrosomes". Selon certains auteurs (de Duve and Wattiaux, 1966 ; Cohn and Ehrenreich, 1969) les "sucrosomes" sont des lysosomes gonflés mais des expériences récentes ont suggéré qu'il s'agit plutôt d'endosomes ou d'organites hybrides gonflés (Bright *et al.*, 1997). Bright *et al.* se sont servis du saccharose pour induire la formation de "sucrosomes" dans le cadre d'une étude sur la biogenèse des lysosomes denses. Ils ont montré par immunoréactivité que les "sucrosomes" induits contiennent le MPR, marqueur endosomal absent des membranes lysosomales. L'effet du saccharose est réversible par internalisation d'invertase, l'enzyme dégradant le saccharose. Une incubation prolongée en présence de saccharose 30 mM fait progressivement disparaître les lysosomes tandis qu'une incubation prolongée de cellules contenant des "sucrosomes" en présence d'invertase fait réapparaître les lysosomes denses. Ces expériences ont mené à la conclusion que les lysosomes denses peuvent se reformer à partir d'organites hybrides.

1.5. Objectif du travail

De nombreuses questions restent posées concernant la biosynthèse des hydrolases lysosomales. S'il est généralement admis que le pilotage fait intervenir principalement le récepteur du Mannose-6-Phosphate jusqu'au endosomes, la manière dont les hydrolases rejoignent le compartiment lysosomal, c'est-à-dire les lysosomes denses, reste relativement obscur.

Cette ultime étape de la biosynthèse des hydrolases, qui s'accompagne dans la plupart des cas d'une maturation protéolytique du précurseur, s'effectue à la frontière endosomes-lysosomes. Le fait que coïncident la transformation protéolytique du précurseur néosynthétisé et la transformation morphologique de l'endosome en lysosome dense nous a mené à nous interroger sur la relation exacte qui pourrait exister entre ces deux phénomènes.

Pour aborder cette question, nous avons consacré ce travail à l'étude de la biosynthèse de la Cathepsine D dans les cellules HepG2, en ayant recours ou non à des conditions de culture provoquant la disparition des lysosomes denses.

1.5. Objectif du travail

De nombreuses questions restent posées concernant la biosynthèse des hydrolases lysosomales. S'il est généralement admis que le pilotage fait intervenir principalement le récepteur du Mannose-6-Phosphate jusqu'au endosomes, la manière dont les hydrolases rejoignent le compartiment lysosomal, c'est-à-dire les lysosomes denses, reste relativement obscur.

Cette ultime étape de la biosynthèse des hydrolases, qui s'accompagne dans la plupart des cas d'une maturation protéolytique du précurseur, s'effectue à la frontière endosomes-lysosomes. Le fait que coïncident la transformation protéolytique du précurseur néosynthétisé et la transformation morphologique de l'endosome en lysosome dense nous a mené à nous interroger sur la relation exacte qui pourrait exister entre ces deux phénomènes.

Pour aborder cette question, nous avons consacré ce travail à l'étude de la biosynthèse de la Cathepsine D dans les cellules HepG2, en ayant recours ou non à des conditions de culture provoquant la disparition des lysosomes denses.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Culture cellulaire

Les cellules utilisées pour toutes les expériences sont des cellules de la lignée HepG2 (hépatome humain). Celles-ci proviennent d'une ancienne et d'une nouvelle lignée : à priori, il n'y a pas de différence entre les deux lignées. La nouvelle lignée a été fournie par l'ATCC (American Type Culture Collections (Rockville, Maryland, USA)). Elles sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) complet et "repiquées" tous les deux à trois jours. Lors du "repiquage", les cellules sont lavées 1x avec du HBSS (Hanks buffered saline solution), trypsinisées et puis, remises en suspension dans du DMEM complet. La culture cellulaire se fait avec du matériel stérile sous une hotte à flux vertical (Clean air).

2.2. Fractionnement cellulaire

2.2.1. But de la manipulation

Le fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle (de Duve *et al.*, 1955) permet de séparer différents organites cellulaires en ayant comme critère de séparation la taille des granules dans un champ centrifuge donné et pendant un temps déterminé. Un fractionnement complet donne les fractions E, N, M, L, P et S.

2.2.2. Matériel

- Cellules HepG2 confluentes
- Homogénéiseur de Dounce (piston B ("tight"))
- Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4
- Saccharose isotonique (0.25M) glacé
- Centrifugeuses (Beckman et International)
- Préparation d'une solution stock de PBS 10x concentré :

NaCl 1.5 M
Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O) 100 mM
NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O) 89 mM

Pour toutes les expériences nous avons utilisé du PBS dilué 10x à partir de la solution stock.

2.2.3. Méthode

Tout le fractionnement se fait sur glace pour ralentir la dégradation enzymatique des organites. Pour faire un fractionnement complet, des cellules HepG2 sont lavées 3x

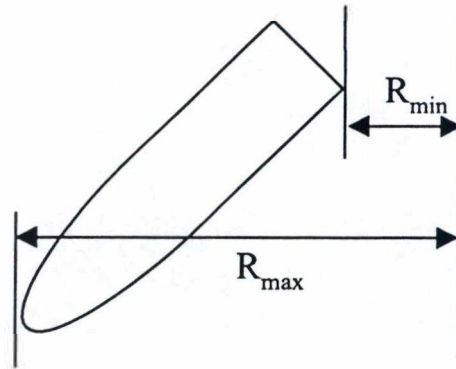


Figure 2.1: Distance radiale dans un rotor de centrifugation.
 $x = R_{av} = (R_{min} + R_{max}) / 2$. x correspond à la distance parcourue par les particules.

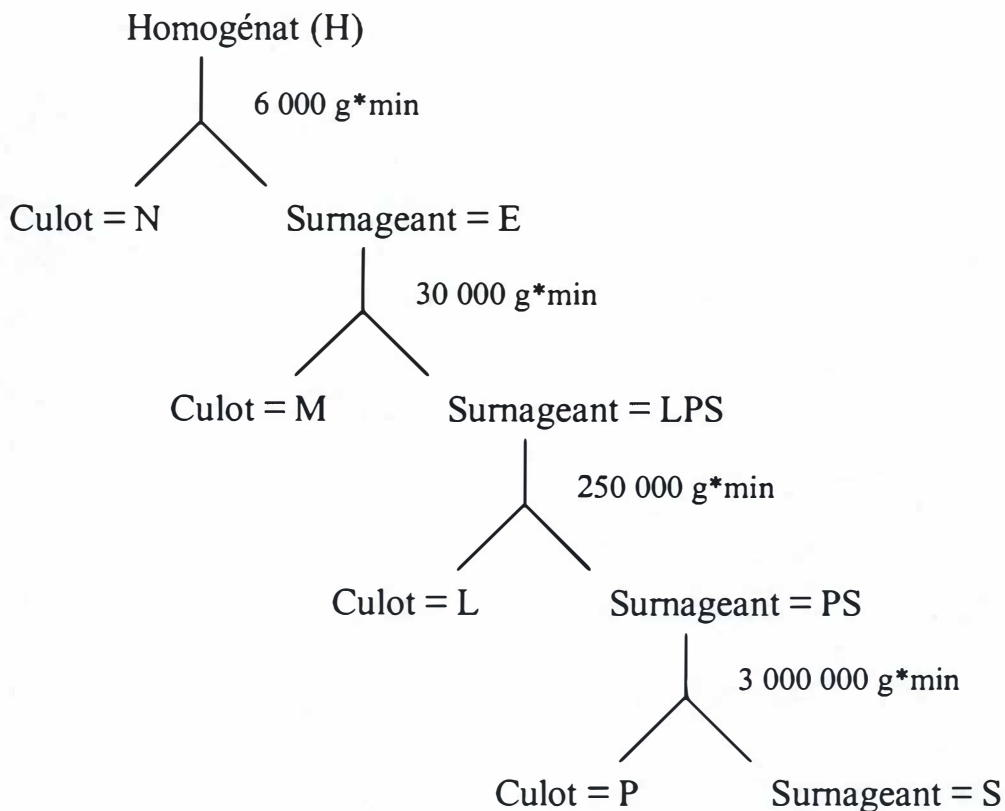


Figure 2.2: Fractionnement complet en centrifugation différentielle. En augmentant progressivement le nombre de g*min, on peut sédimenter les fractions N, M, L, P et S.

avec du PBS et 3x avec du saccharose isotonique glacé. Le PBS sert à éliminer le sérum tandis que le saccharose élimine les sels. Les cellules, en suspension dans du saccharose isotonique glacé, sont récoltées dans un Dounce. Après 4 passages dans le Dounce (piston "tight"), l'homogénat contenant les organites est soumis à une centrifugation différentielle. En augmentant progressivement le nombre de g*min, on peut sédimenter différents organites. Le nombre g (champ gravifique) est donné par la relation : $g = \omega^2 x / 981$. Le terme ω représente la vitesse angulaire et x correspond à la distance radiale (en cm, **fig.2.1**). La vitesse angulaire est donnée par la relation : $\omega = (2\pi \text{rpm} / 60)$ où rpm représente les rotations par minute du rotor. Par convention, on considère x comme le rayon moyen : $x = (R_{\min} + R_{\max}) / 2$. La valeur de x est déterminée par le type de rotor. Le fractionnement complet en centrifugation différentielle permet de séparer les fractions suivantes (**fig.2.2**) :

- Fraction N : (fraction) enrichie en noyaux mais contenant aussi les cellules qui n'ont pas été brisées lors de l'homogénéisation, du réticulum endoplasmique, de la membrane plasmique et des débris cellulaires
- Fraction M : cette fraction enrichie en mitochondries constitue la fraction mitochondriale lourde. Elle contient également des peroxysomes et des lysosomes. Dans le cas de N et M, le culot se détache facilement ce qui rend la décantation très délicate (décantation minimale).
- Fraction L : fraction mitochondriale légère contient essentiellement des lysosomes, des endosomes et des peroxysomes, mais aussi des mitochondries et déjà des microsomes. Il faut noter que dans le cas de la fraction L, on obtient un culot double. Le culot de L est surmonté d'un culot correspondant à des microsomes. Dans ce cas nous décantons au maximum, c'est-à-dire que nous tentons de décanter le plus possible de microsomes.
- Fraction P : fraction microsomale, contient des petites vésicules des endosomes, du RER, du REL, du Golgi et de la membrane plasmique.
- Fraction S : fraction soluble qui rassemble tous les éléments non-sédimentables dans ces conditions de centrifugation (ribosomes, éléments du cytosquelette, du cytosol...) et les éléments solubilisés lors des manipulations.

2.3. Dosage des activités enzymatiques

2.3.1. But de la manipulation

Le dosage de l'activité de différentes enzymes marqueurs permet de vérifier la distribution des organites dans les différentes fractions (activité totale) mais aussi de vérifier l'état dans lequel se trouvent les organites après l'homogénéisation (activités libres et totales). Le dosage des protéines par la méthode de Folin permet de connaître le pourcentage en protéines dans les différentes fractions.

2.3.2. Matériel

2.3.2.1. Dosage de la Cathepsine C (enzyme marqueur des lysosomes)

- Substrat : glycyl-arginyl- β -naphtylamide ($M = 383$ Da) (Bachem) en solution stock 0.5 mM dans du tampon acétate 0.06 M.
- Le dosage de la Cathepsine C se fait en incubant l'enzyme avec une mixture contenant le substrat et un activateur nécessaire à la réaction.
- Mixture :

Substrat 0.25 mM Tampon acétate 0.06 M pH 5 Saccharose 0.25 M

- Activateur :

<u>Activateur total</u> : Aminoéthanethiol (AET) (Sigma) 5 mM Tampon acétate 0.05 M pH 5 Saccharose 0.25 M Triton X-100 1 %	<u>Activateur libre</u> : Aminoéthanethiol (AET) 5 mM Tampon acétate 0.05 M pH 5 Saccharose 0.25 M
---	---

- Les réactions de dosage sont arrêtées avec du fixateur qui se compose de :

Glycine 50 mM EDTA (éthylènediaminetétraacétate) 5 mM Triton X-100 0.05 % → pH 10.5 (avec NaOH)
--

2.3.2.2. Dosage de la β -Galactosidase (enzyme marqueur des lysosomes)

- Substrat : 4-méthylumbelliféryl- β -D-galactoside ($M = 338.3$ Da) (Sigma) en solution stock 40 mM dans du DMSO (diméthylsulfoxyde)
- Mixture :

<u>Activité totale</u> : Substrat 0.5 mM NaCl 0.05 M Tampon acétate 50 mM pH 5 Saccharose 0.25 M Triton X-100 0.05 %	<u>Activité libre</u> : Substrat 0.5 mM NaCl 0.05 M Tampon acétate 50 mM pH 5 Saccharose 0.25 M
---	---

2.3.2.3. Dosage de la α -Glucosidase Alcaline (enzyme marqueur du réticulum endoplasmique)

- Substrat : 4-méthylumbelliféryl- α -D-glucopyranoside (M = 338.3Da) (Sigma) en solution stock 10m M dans du DMSO
- Mixture:

Substrat 0.1 mM
Tampon glycine NaOH 60 mM pH 9
Triton X-100 0.02 %

2.3.3. Méthode

2.3.3.1. Dosage des activités enzymatiques

Pour doser l'activité de la Cathepsine C, nous avons incubé 430 μ l de mixture avec 50 μ l d'activateur (libre ou total) et 20 μ l de la fraction (diluée si nécessaire) pendant 10 minutes à 37°C. La fraction est ajoutée en dernier lieu. Après 10 minutes, la réaction est arrêtée avec 1.3ml de fixateur. Le fixateur contient de l'EDTA et du Triton ; l'EDTA est une substance qui complexe les cations lourds et le Triton solubilise les débris éliminant un trouble éventuel. Le pH élevé du fixateur est nécessaire à la fluorescence des molécules et de plus, l'activité enzymatique est très réduite à pH 10.5. La Cathepsine C libère la naphtylamine qui est une molécule fluorescente. La lecture au fluorimètre (Aminco) se fait à 365 nm en excitation et à 450 nm en émission avec un Haut Voltage (HV) approprié (600-700). Le HV augmente la sensibilité du monochromateur qui détecte la fluorescence émise.

Pour doser la β -Galactosidase nous avons incubé 180 μ l de mixture (libre ou totale) avec 20 μ l de la fraction contenant l'enzyme (diluée si nécessaire) pendant 10 minutes à 37°C et ensuite, nous avons arrêté la réaction avec 1.3 ml de fixateur. La lecture de la fluorescence émise par le méthylumbelliférone se fait à 365 nm en excitation et à 450 nm en émission avec un HV de 600-700.

L'activité de la α -Glucosidase Alcaline est mesurée en incubant 20 μ l de la fraction avec 180 μ l de mixture à 37°C de 20 à 40 minutes (enzyme moins active). La lecture se fait à 365 nm en excitation et à 450 nm en émission avec un HV de 600-700.

Pour chaque dosage, on effectue également une mesure sur un Blanc. Les absorbances obtenues au fluorimètre sont multipliées par la valeur de la dilution (primaire et secondaire) pour calculer l'activité de l'enzyme. Le pourcentage d'activité

dans chaque fraction est obtenu en rapportant l'activité de chaque fraction à la somme des activités des cinq fractions (N, M, L, P et S).

2.3.3.2. Dosage des protéines

Pour doser les protéines, 100 µl d'un kit A contenant du NaOH, du carbonate de sodium, du tartrate sodico-potassique et du sulfate de cuivre sont ajoutés à 20 µl de fraction et le mélange est agité au Vortex. Puis, 800µl d'un kit B contenant du phosphomolybdate et du phosphotungstate (Folin dilué) sont ajoutés de minute en minute et agités au Vortex pendant 20 secondes. À la 15^{ème} minute, l'absorbance est lue à 750 nm au spectrophotomètre (Perkin Elmer). Cette absorbance, lue au spectrophotomètre pour chaque fraction, est multipliée par la valeur de la dilution (primaire et secondaire) pour connaître la quantité de protéines de chaque fraction. Le pourcentage de protéines de chaque fraction est obtenu en rapportant la quantité de chaque fraction sur la somme des quantités de toutes les fractions (N, M, L, P et S).

En connaissant pour chaque fraction le pourcentage de protéines et le pourcentage d'activité enzymatique, il est facile de calculer l'activité spécifique relative (ASR) des enzymes dans les différentes fractions. Il suffit de diviser pour chaque fraction le pourcentage d'activité par le pourcentage de protéines. L'ASR équivaut à l'état de purification de l'enzyme dans la fraction. Pour représenter en graphique un fractionnement complet, l'ASR est portée en ordonnée et le pourcentage de protéines est porté en abscisse. Sur un tel histogramme, chaque fraction est représentée par un rectangle dont la surface correspond au pourcentage d'activité de l'enzyme.

2.4. Centrifugation en gradient de Percoll

2.4.1. But de la manipulation

Une centrifugation en gradient de Percoll permet de séparer des organites subcellulaires en fonction de leur densité. Nous nous intéressons au comportement d'une fraction L enrichie en lysosomes lors d'une centrifugation en gradient de Percoll. Le gradient de Percoll en milieu isotonique de saccharose n'a pas d'effet osmotique contrairement au gradient saccharose. Les organites sédimentent à leur densité propre (si ce gradient couvre la densité des organites).

2.4.2. Matériel

- Cellules HepG2 confluentes
- PBS pH 7.4
- Dounce (piston B)

- Saccharose isotonique glacé
- Percoll (Sigma)
- Mixtures pour dosages enzymatiques
- Centrifugeuse Beckman
- Préparation du gradient de Percoll :

Percoll 18.55 %
 Imidazole 3 mM pH 7.4
 Saccharose 0.25 M

2.4.3. Méthode

Nous avons effectué un fractionnement de cellules HepG2 confluentes pour séparer une fraction L enrichie en lysosomes. Cette fraction L est resuspendue dans 500 µl de saccharose isotonique glacé et déposée sur 4.7 ml de la solution de Percoll. Nous avons centrifugé cette fraction L déposée sur la solution de Percoll dans un rotor SW 65 à 25000 rpm pendant une heure (3.7×10^6 g*min). Le Percoll est une solution de grains de silice qui sédimentent pendant la centrifugation pour constituer un gradient autoformé. Les organites, ayant une taille inférieure aux grains de silice, sédimentent moins vite et peuvent rejoindre leur densité dans le gradient. Après centrifugation, nous avons coupé le gradient en 11 ou 13 fractions et nous avons mesuré l'activité d'enzymes marqueurs.

2.5. Marquage métabolique de la Cathepsine D

2.5.1. But de la manipulation

Nous marquons des cellules HepG2 avec de la méthionine marquée au ^{35}S . Après, nous effectuons une immunoprécipitation (cf. § 2.7.) de la Cathepsine D par l'anticorps (AC) anti-Cathepsine D humaine pour suivre la biosynthèse de la Cathepsine D au cours du temps.

2.5.2. Matériel

- Cellules HepG2 confluentes
- DMEM complet
- DMEM déficient (en sérum et en méthionine)
- DMEM contenant de la méthionine marquée au ^{35}S 950 kBq/ml DMEM
- HBSS
- PBS pH 7.4
- Tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases

- Préparation du tampon de lyse :

PBS pH 7.4
 Triton X-100 2 %
Inhibiteurs de protéases:
 Iodoacétamide (iAA) 14 mM
 Phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF) 2.8 mM
 Ethylènediaminetétraacétique (EDTA) 2.8 mM pH 7.4
 Leupeptine 5.6 µg/ml
 Aprotinine 2.8 µg/ml
 Pepstatine 1 µg/ml

2.5.3. Méthode

Des cellules HepG2 confluentes sont mises à jeun dans du DMEM déficient (en sérum et en méthionine) pendant une heure. Après, les cellules subissent un "pulse" de 30 minutes dans du DMEM déficient contenant de la méthionine marquée au soufre radioactif (950 kBq/ml DMEM). Le "pulse" est suivi d'une "chasse" de durée variable (2, 4 et 6 heures) dans du DMEM complet. Après trois rinçages avec du PBS, les cellules sont récoltées dans des tubes Eppendorf en ajoutant du tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases. Finalement, les tubes sont agités 3 x 30 secondes au Vortex pour homogénéiser les lysats cellulaires. Les tubes sont congelés à -70°C et l'immunoprécipitation est réalisée généralement le lendemain.

2.6. **Maturation *in vitro* de la Cathepsine D**

2.6.1. But de la manipulation

Le but de cette expérience est de faire maturer la Cathepsine D en dehors d'une cellule vivante selon le protocole de Gieselmann *et al.* (1985). La maturation se fait en incubant une fraction L (ou MLP) pendant 3 heures à 37°C dans différentes conditions. Le milieu de maturation est un milieu dont la tonicité est assurée par des ions phosphate (pH 7.2).

2.6.2. Matériel

- Cellules HepG2 confluentes
- DMEM complet
- DMEM déficient (en sérum et en méthionine)
- DMEM contenant de la méthionine marquée au ³⁵S [950 kBq/ml DMEM]
- HBSS
- PBS pH 7.4
- Dounce (piston B)
- Saccharose isotonique glacé
- Centrifugeuses (Beckman et Internationale)

- Tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases
- Milieu isotonique en phosphate pour la maturation
- Mixtures pour dosages enzymatiques

- Le milieu de maturation contient selon le cas :

ATP 3 mM
 DTT (dithiotreitol) 0.5 mM
 Triton X-100 0.5 %
 Solution tamponnée en phosphate

- La solution tamponnée en phosphate contient :

K_2HPO_4 50 mM pH7.2
 NaH_2PO_4 20 mM pH7.2
 $MgCl_2$ 5 mM

2.6.3. Méthode

Des HepG2 confluentes sont mises à jeun pendant une heure (DMEM déficient) puis subissent un "pulse" de 30 minutes (DMEM déficient marqué). Le "pulse" est suivi d'une "chasse" de 90 minutes dans du DMEM complet. Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS, 3 fois avec du saccharose isotonique glacé et puis homogénéisées (4 passages dans le Dounce). Ensuite nous avons séparé en centrifugation différentielle une fraction L ou MLP que nous avons resuspendue dans 250 μ l de saccharose 0.25 M glacé.

La maturation *in vitro* se fait en incubant 50 μ l de fraction L et MLP pendant trois heures dans un milieu isotonique en phosphate (pH 7.2) suivant le schéma qui suit :

1. L et MLP sont incubées à 0°C. Cette incubation permet de déterminer le matériel de départ après 90 minutes de chasse.
2. Incubation à 37°C en milieu isotonique. Ce témoin nous montre si la maturation peut se faire.
3. Incubation à 37°C avec de l'ATP en concentration finale 3 mM. L'ATP devrait favoriser la maturation en activant l'acidification des granules par la pompe à protons.
4. Incubation à 37°C avec de l'ATP (3 mM) et du DTT en concentration finale 0.5 mM. Le DTT est un agent réducteur qui ralentit l'oxydation des membranes.
5. Avec ATP et DTT et Triton X-100 0.5 % à 37°C : le Triton en tant que détergent pourrait inhiber la maturation si celle-ci nécessite des granules intacts.

À la fin de la maturation, la mesure de l'activité libre et totale de la Cathepsine C nous a permis de vérifier l'état dans lequel se trouvaient les organites.

Après les 3 heures d'incubation, nous avons arrêté la réaction en ajoutant 400 µl de tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases. Nous avons homogénéisé les échantillons en agitant 3x30 secondes au Vortex et congelé les tubes à -70°C. Le lendemain, nous avons immunoprécipité la cathepsine D.

2.7. Immunoprécipitation de la Cathepsine D

2.7.1. But de la manipulation

Le but est d'immunoprécipiter la Cathepsine D (Gieselmann *et al.*, 1983) par l'AC anti-Cathepsine D humaine (AC polyclonal) qui reconnaît les trois formes de la Cathepsine D (précurseur, intermédiaire et mature). Les trois formes sont séparées en gel de polyacrylamide 10% contenant un détergent, le SDS (sodium dodecyl sulfate) (Hasilik and Neufeld, 1980).

2.7.2. Matériel

- Protéine A-Sépharose CL-4B (Amersham-Pharmacia)
- AC anti-Cathepsine D humaine (PROSAN)
- RIPA
- Bleu de bromophénol 2x avec du DTT
- Étalon C₁₄
- Gel de polyacrylamide 10% avec SDS

- Préparation du RIPA :

PBS pH 7.4
 SDS 1 g/l
 DOC (déoxycholate de sodium, détergent) 3.5 mM
 Triton X-100 1 %

- Préparation de bleu de bromophénol 2x :

TRIS / HCL 0.1 M pH6.8
 Glycérol 10 %
 Ethylènediaminetétraacétate (EDTA) 5 mM
 Bleu de bromophénol 75 µg/ml
 SDS 3.3 %
 DTT 42 mM

- Préparation d'un gel SDS/PAGE 10% :

Running gel : Bisacrylamide 33 % TRIS 400 mM pH 8.8 TEMED (tétraméthylènediamine) 0.1 % (polymérisant) SDS 0.1 % APS (persulfate d'ammonium) 0.06 % (polymérisant ; ajouté en dernier lieu)	Stacking gel : Bisacrylamide 16 % TRIS 70 mM pH6.8 TEMED 0.1% SDS 0.1 % APS 0.06 %
--	--

– L'étalon (^{14}C) de poids moléculaire :

200 kDa myosin
97.4 kDa phosphorylase B
66 kDa bovine serum albumin
46 kDa ovalbumin
30 kDa carbonic anhydrase
14.3 kDa lysozyme (sort du gel à 10%)

2.7.3. Méthode

Les échantillons contenant les lysats (issus du marquage métabolique ou de la maturation) sont décongelés et agités 3x30 secondes au Vortex. Toutes les opérations se font à 4°C. Nous avons centrifugé les échantillons pour éliminer les débris. Nous avons ajouté au surnageant 50 μl de Protéine A-Sépharose (PAS) et puis, les échantillons sont mélangés 1 heure sur un rotamix. Après cette préadsorption par la PAS (de tout ce qui n'est pas Cathepsine D), nous avons centrifugé les échantillons pour éliminer les billes. Ensuite nous avons ajouté au surnageant 2 μl de l'AC anti-Cathepsine D humaine qui reconnaît les trois formes de la Cathepsine D. Après 90 minutes de mélange sur le rotamix, nous avons ajouté à nouveau 50 μl de PAS qui fixe le complexe AC-Cathepsine D.

Après 90 minutes, nous avons effectué 7 lavages au RIPA pour éliminer les contaminations. Chaque lavage est suivie d'une centrifugation permettant de sédimenter les billes ; le surnageant est aspiré, du nouveau RIPA est ajouté et les échantillons sont mélangés. Ensuite 1 lavage au RIPA dilué 10x a été effectué pour éliminer les sels. Après, nous avons ajouté 30 μl de bleu de bromophénol 2x contenant du DTT ; à partir de ce moment il n'est plus nécessaire de travailler sur glace car le bleu contient du SDS et du DTT (milieu réducteur).

Les échantillons sont agités 3x30 secondes au Vortex et puis, chauffés à 95°C pendant 5 minutes pour détacher le complexe AC-Cathepsine D de la PAS et dissocier le complexe AC-Cathepsine D. Les échantillons sont agités à nouveau 3x30 secondes au Vortex et centrifugés pour sédimenter les billes. Le surnageant, contenant la Cathepsine D, est déposé sur un gel de polyacrylamide à 10 % (avec du SDS). Le SDS est un détergent ionique dénaturant les protéines ; ainsi les protéines, chargées négativement ne migrent qu'en fonction de leur taille. La migration dans le gel permet de séparer les différentes formes de la Cathepsine D qui se distinguent par leur poids moléculaire.

Après migration des protéines (1 nuit à 5 mA), le gel est fixé dans un mélange de méthanol (40 %) et d'acide acétique (5 %), puis séché à 80 °C pendant 2 heures et mis en cassette sur un écran sensible au rayonnement β pendant 5-6 jours. La révélation se fait grâce à un système "phosphorimager" (Packard).

2.8. Mesure du pH intralysosomal

Nous avons essayé d'estimer le pH intralysosomal en mettant au point une technique de mesure selon un protocole expérimental de Ohkuma and Poole (1978), adapté par Schmid *et al.*, (1999). Le principe de la mesure est basé sur les propriétés fluorescentes de la Fluoresceine isothiocyanate couplée au dextran (FD). Le FD est endocyté par les cellules et s'accumule dans les lysosomes sans dégradation. Le spectre fluorescent du FD se caractérise par deux pics différents de fluorescence émise soit en milieu acide soit en milieu alcalin. Le pic en milieu acide est détecté suite à une excitation à 455 nm et le pic en milieu alcalin suite à une excitation à 493 nm pour une émission dans les deux cas à 517 nm. La fluorescence émise par la molécule excitée varie en fonction du pH dans les lysosomes. Pour déterminer le pH correspondant à la fluorescence émise nous nous sommes référés à une courbe d'étalonnage établie en plaçant la molécule dans du tampon acétate 50 mM à pH variable. La mise au point de la mesure du pH intralysosomal est développée au chapitre "Résultats et Discussions" au point 3.6.

Résultats et Discussions

3. Résultats et Discussions

3.1. Introduction

3.1.1. Les "dense core lysosomes"

On sait depuis longtemps que les lysosomes ont tendance à se retrouver dans les fractions denses après centrifugation dans un gradient de densité (Beaufay *et al.*, 1964). Ce comportement des lysosomes a été confirmé notamment lors d'études sur la biosynthèse d'hydrolases, où on a retrouvé une fraction importante d'enzymes matures, actives dans les fractions denses d'un gradient de Percoll (Gieselmann *et al.*, 1983 ; Gieselmann *et al.*, 1985 ; Capony *et al.*, 1994). On parle pour cette raison de "dense core lysosomes" pour décrire le comportement des lysosomes s'équilibrant dans les fractions denses.

Le Percoll correspond à des grains de silice qui sédimentent en centrifugation pour former un gradient ; on parle de gradient autoformé. La centrifugation en gradient de Percoll permet de séparer des organites dans un milieu dont on peut contrôler la tonicité. Les lysosomes étant plus denses que les autres organites du trafic membranaire, se retrouvent dans les régions denses du gradient après centrifugation. L'avantage d'un gradient de Percoll par rapport à un gradient de saccharose est l'absence d'un effet osmotique du Percoll sur les granules. Ceci fait que, dans un gradient de Percoll, les organites s'équilibrent à un point qui correspond à leur densité, dans le milieu dont l'expérimentateur choisit la tonicité.

3.1.2. Existence d'une "matrice" intralysosomale

Il existe des indications que des enzymes lysosomales s'agrègent dans un milieu dont le pH est proche du pH intralysosomal (Buckmaster *et al.*, 1988 ; Jadot *et al.*, 1996 ; Jadot *et al.*, 1997). Les expériences de ces auteurs ont été réalisées sur une fraction L enrichie en lysosomes ou sur des lysosomes purifiés en gradient de Nycodenz (Wattiaux *et al.*, 1978). Les granules ont été soumis à une ultrasonication pour rompre les membranes. On a ensuite sédimenté les membranes détruites pour obtenir un extrait lysosomal. Le pH de l'extrait a été ajusté à 5 et on a effectué une

centrifugation à haute vitesse. En comparant les activités enzymatiques dans le culot et le surnageant on a trouvé que plusieurs hydrolases comme la Cathepsine D, la N-acétylglucosaminidase, la β -glucuronidase, l'arylsulfatase mais aussi la forme soluble de la protéine de membrane lysosomale *lamp-2* s'agrègent à pH acide.

Lorsque pareil extrait lysosomal (Jadot *et al.*, 1997), porté à pH 5 et à une densité de 1.24 g/ml, est déposé sous un gradient linéaire de saccharose (1.09-1.22 g/ml), une centrifugation à haute vitesse suivie de l'analyse de la distribution des protéines lysosomales dans les fractions du gradient, montre que de nombreuses protéines dont l' α -mannosidase et la forme soluble de *lamp-2* sont capables de "flotter" dans le gradient. L'explication pour cette "flottation" observée à pH 5 serait l'association des enzymes à des lipides comme la sphingomyéline, la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine, ce qui diminuerait leur densité. Cette explication est notamment basée sur la constatation qu'une expérience du même type répétée en présence de Triton X-100 ne permet pas de mettre en évidence la "flottation" des mêmes protéines.

En comparant des expériences d'agrégation et de "flottation" telles que décrites ci-dessus, et réalisées soit à pH 5, soit à pH 8, on a pu mettre en évidence une corrélation entre les deux phénomènes. Ces expériences d'agrégation et de flottation posent la question de l'existence *in situ* d'une "matrice" intralysosomale organisant le contenu enzymatique du lysosome (Buckmaster *et al.*, 1988).

Si pareille "matrice" insoluble existe dans les lysosomes, on peut se demander quel pourrait être son rôle physiologique. On pourrait attribuer à cette "matrice" intralysosomale plusieurs fonctions hypothétiques :

- Il est possible que l'agrégation de précurseurs d'hydrolases lysosomales contribue au ciblage des enzymes lysosomales jusqu'aux lysosomes par une voie indépendante du Mannose-6-Phosphate (Zhu and Conner, 1994 ; Jadot *et al.*, 1997).
- Une telle "matrice" pourrait intervenir dans la régulation de l'activité enzymatique ou favoriser la formation d'assemblages supramoléculaires d'hydrolases intervenant dans une même chaîne métabolique (Jadot *et al.*, 1997).

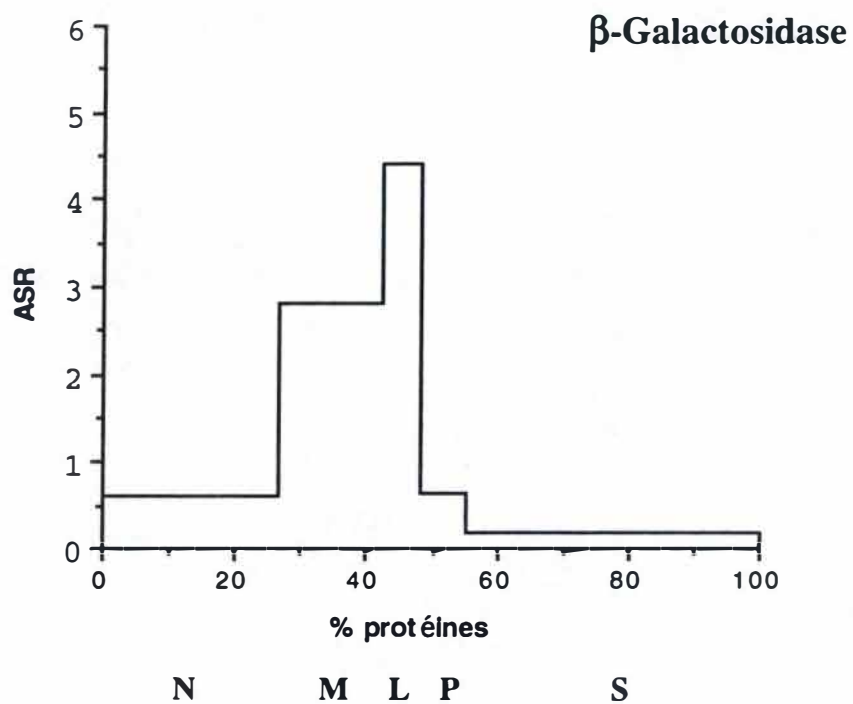
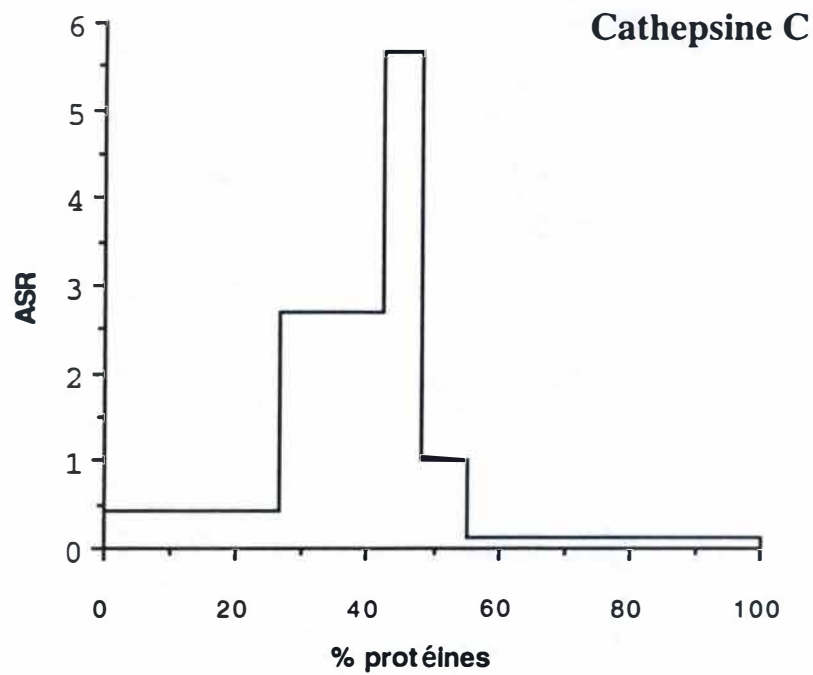


Figure 3.1 : Distribution de la Cathepsine C et de la β -Galactosidase. Des cellules HepG2 confluentes ont été homogénéisées et fractionnées en centrifugation différentielle comme décrit dans "Matériel et Méthodes". L'activité des enzymes a été mesurée dans toutes les fractions.

ASR : Activité Spécifique Relative

- L'organisation du contenu enzymatique pourrait intervenir dans la régulation de la stabilité des hydrolases en réduisant leur accessibilité vis-à-vis des protéases acides qui dégradent les protéines lysosomales.
- La formation d'agrégats pourrait constituer un mécanisme de rétention des protéines dans les lysosomes lors de la formation de vésicules de transport (Buckmaster *et al.*, 1988).
- Cette "matrice" pourrait intervenir dans la maturation protéolytique de précurseurs d'hydrolases lysosomales.

En constatant les deux phénomènes (agrégation du contenu des lysosomes et densité élevée de l'organite), on peut s'interroger sur la relation qui pourrait exister entre ces deux observations. Le fait qu'un extrait lysosomal est capable de s'agréger dans un milieu dont le pH est proche du pH intralysosomal évoque l'idée que l'agrégation intralysosomale pourrait se faire avant ou pendant l'apparition des "dense core lysosomes" (Buckmaster *et al.*, 1988, Reaves *et al.*, 1998).

Parmi les rôles hypothétiques attribuables à la "matrice" intralysosomale, nous nous sommes intéressés particulièrement à celui de la maturation protéolytique des précurseurs d'hydrolases lysosomales. On sait que la Cathepsine D est concernée par le phénomène d'agrégation (Jadot *et al.*, 1997). Nous avons donc choisi de suivre la biosynthèse de la Cathepsine D pour aborder l'étude de l'intervention de la "matrice" lysosomale dans le processus de maturation protéolytique des hydrolases du lysosome.

3.2. Centrifugation en gradient de Percoll

Nous avons choisi de travailler avec des cellules HepG2, choisies par d'autres pour étudier la synthèse de la Cathepsine D (Delbrück *et al.*, 1994 ; Rijnboutt *et al.*, 1991 ; Rijnboutt *et al.*, 1992). Nous nous sommes d'abord intéressés au comportement en centrifugation en gradient de Percoll isotonique des lysosomes des cellules HepG2.

Pour disposer du matériel nécessaire à une centrifugation en gradient de Percoll, nous avons, dans un premier temps, fractionné un homogénat de cellules HepG2 par centrifugation différentielle (de Duve *et al.*, 1955). A cette fin, des cellules HepG2 ont été homogénéisées dans du saccharose isotonique (0.25 M) glacé et soumises à une centrifugation différentielle pour séparer les différentes fractions (N, M, L, P et S). Sur

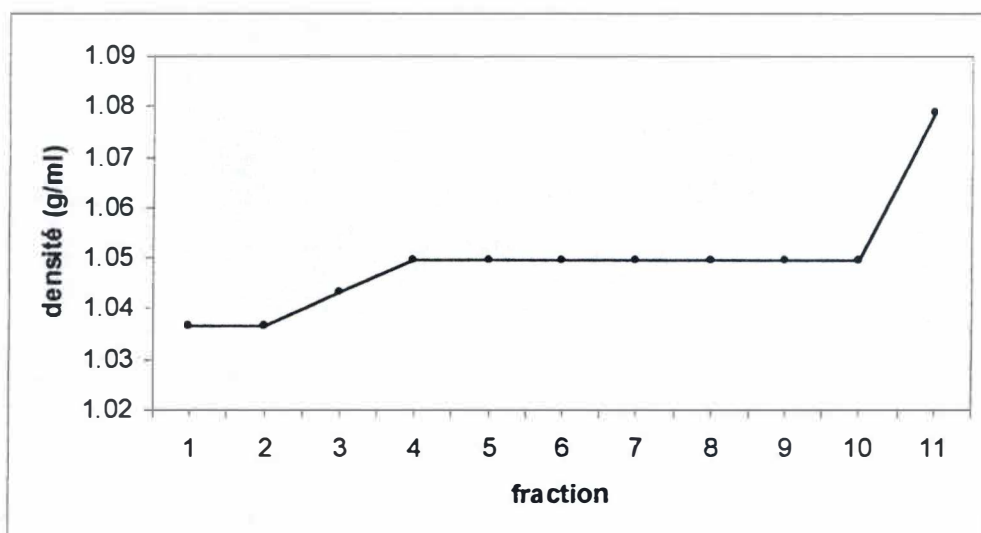
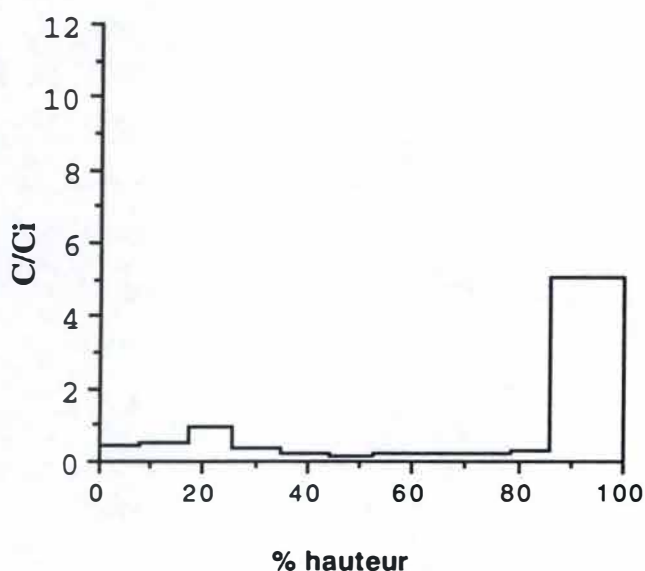
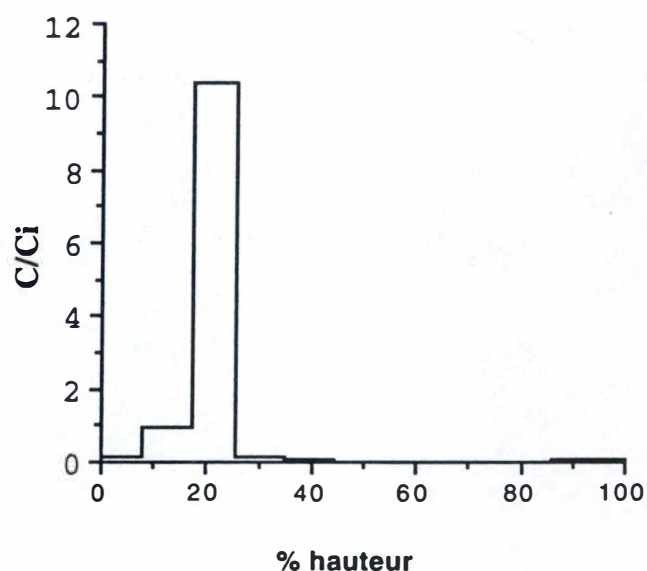


Figure 3.2a : Evolution de la densité dans les fractions issues d'une centrifugation en gradient de Percoll d'une fraction L.

Cathepsine C



α -Glucosidase Alcaline



Figures 3.2b et 3.2c : Centrifugation sur gradient de Percoll d'une fraction L qui a été séparée à partir de cellules HepG2 confluentes. Cette fraction a été centrifugée sur gradient de Percoll et l'activité de la Cathepsine C et de l' α -Glucosidase Alcaline a été mesurée dans les 11 fractions du gradient.

C/Ci : Concentration / Concentration initiale

la figure 3.1 on peut observer la distribution d'enzymes marqueurs des lysosomes (Cathepsine C et β -Galactosidase). L'ASR représente la purification de l'enzyme dans la fraction ; elle correspond au pourcentage de l'activité de l'enzyme dans la fraction sur le pourcentage de protéines totales dans la fraction. Pour la Cathepsine C, nous avons trouvé 32.8 % d'activité dans la fraction L et une ASR égale à 5.7. L'ASR de la β -Galactosidase dans la fraction L vaut 4.4 représentant 25.6 % d'activité. Ces résultats, fort semblables à ceux obtenus couramment à partir de foie de rat, montrent que la centrifugation différentielle permet l'obtention d'une fraction L enrichie en lysosomes et que la majorité des lysosomes sédimentent dans les fractions M, L et P.

Pour étudier le comportement en gradient de densité des lysosomes des cellules HepG2, nous avons effectué une centrifugation en gradient de Percoll d'une fraction L enrichie en lysosomes. Dans ce but, des cellules HepG2 ont été homogénéisées dans un milieu contenant de l'imidazole 3 mM (Gieselmann *et al.*, 1983) et soumises à une centrifugation différentielle pour séparer une fraction L. Cette fraction L a ensuite été centrifugée en gradient de Percoll. Nous avons coupé 11 fractions dans le gradient issu de la centrifugation et dans ces fractions nous avons mesuré la densité et l'activité d'enzymes marqueurs (Cathepsine C et α -Glucosidase Alcaline). La figure 3.2a permet de suivre l'évolution de la densité dans les fractions après la centrifugation. Lors de la centrifugation s'est formé un gradient de densité qui évolue pour atteindre un maximum dans la dernière fraction (vers 1.08 g/ml). Sur la figure fig.3.2b, on observe que 70.3 % de l'activité de la Cathepsine C se retrouve dans les fractions denses du gradient, ce qui indique la présence de lysosomes dans le fond du gradient. Ces résultats sont en accord avec la présence de "dense core lysosomes" dans les cellules HepG2 (Rijnboutt *et al.*, 1991). Toutefois, en voyant cette activité importante de la Cathepsine C dans le fond du gradient, on peut se demander si la centrifugation en gradient de Percoll n'a pas "entraîné" tous les organites cellulaires dans la zone de forte densité du gradient. Pour nous assurer que ceci n'est pas le cas, nous avons également mesuré l'activité de l' α -Glucosidase Alcaline, une enzyme marqueur du réticulum endoplasmique, dans les 11 fractions du gradient (fig.3.2c). En suivant la distribution de l'activité de l' α -Glucosidase dans les fractions du gradient, on trouve 96.7 % de l'activité dans les trois premières fractions du gradient (vers 1.04 g/ml). Ceci nous laisse penser que l'activité de la Cathepsine C dans la fraction la plus dense

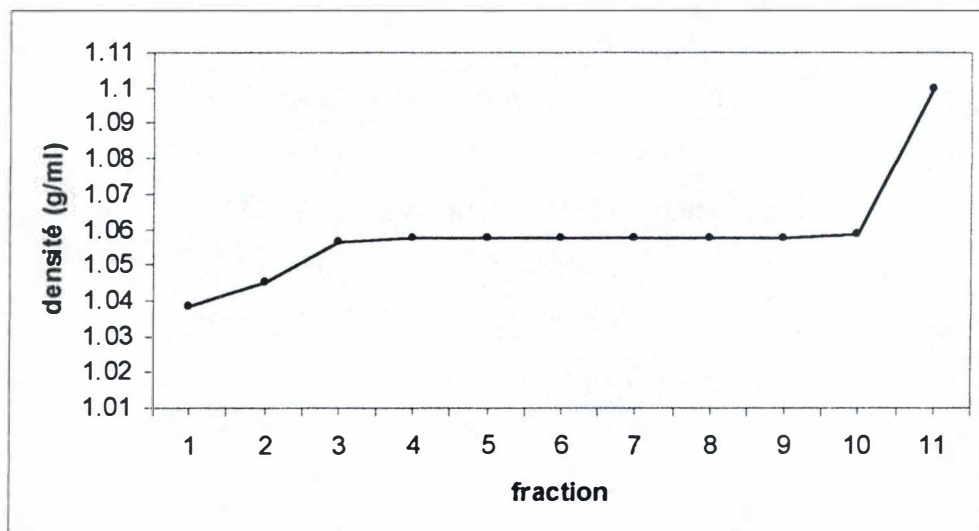
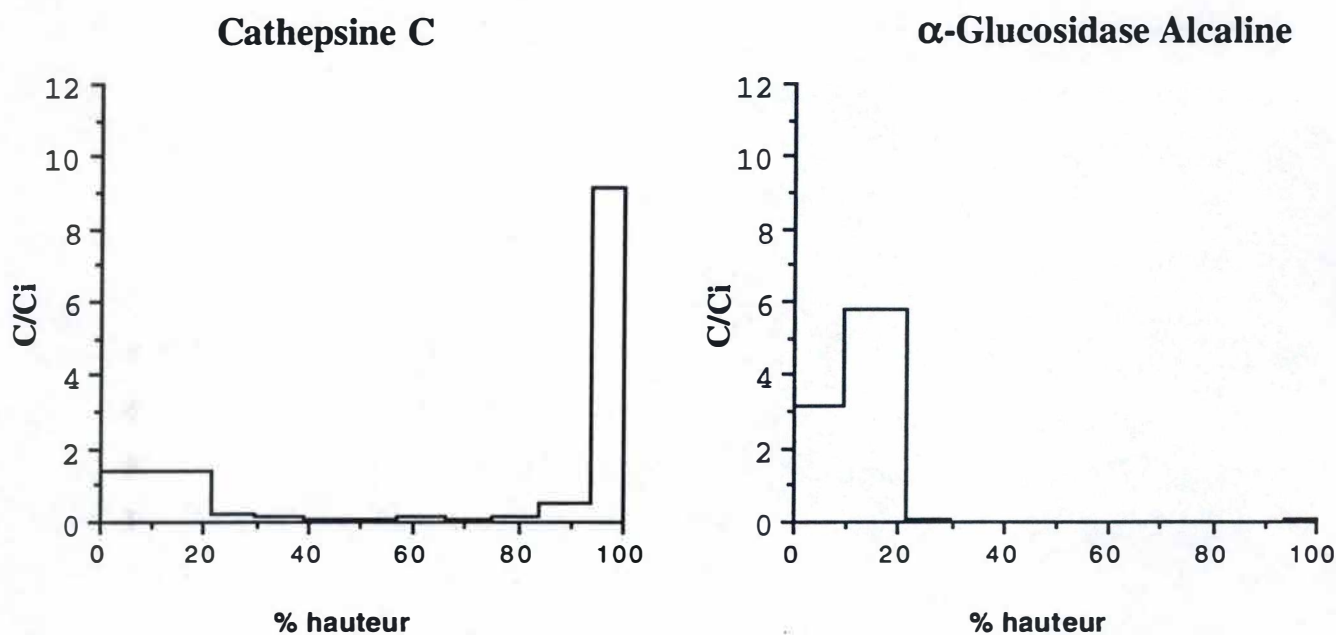


Figure 3.3a : Evolution de la densité dans les fractions issues d'une centrifugation en gradient de Percoll d'une fraction MLP.



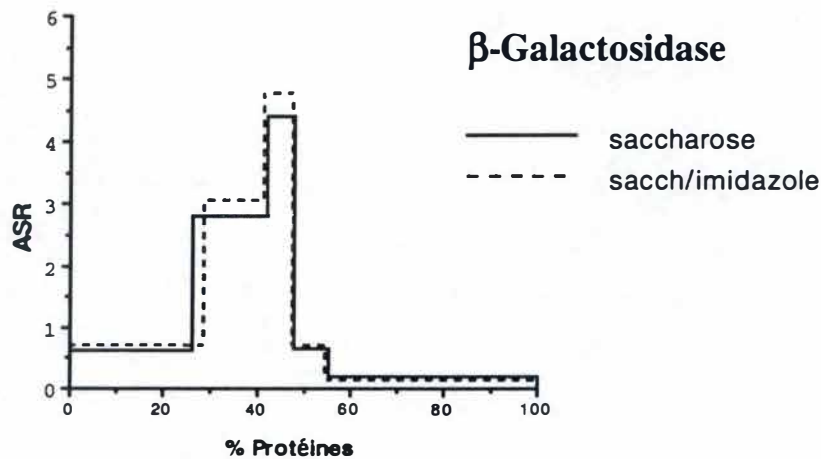
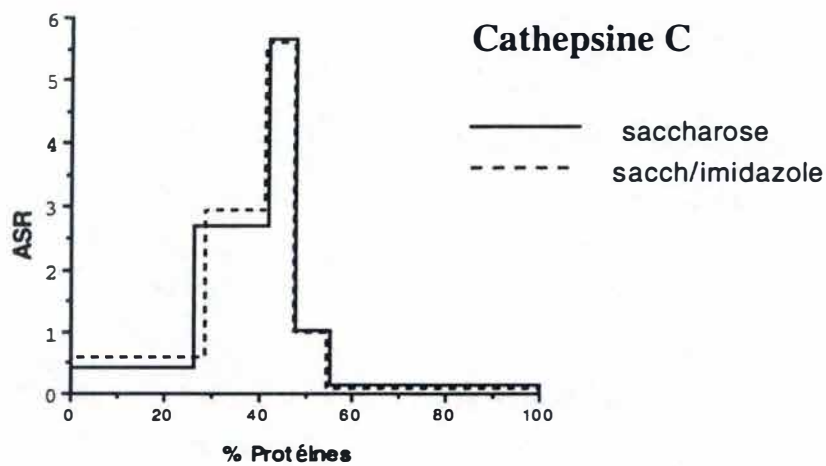
Figures 3.3b et 3.3c : Centrifugation sur gradient de Percoll d'une fraction MLP qui a été séparée à partir de cellules HepG2 confluentes. Cette fraction a été centrifugée sur gradient de Percoll et l'activité de la Cathepsine C et de l' α -Glucosidase Alcaline a été mesurée dans les 11 fractions du gradient.

C/Ci : Concentration / Concentration initiale

reflète la présence de "dense core lysosomes", tels que décrits dans la littérature (Gieselmann *et al.*, 1983 ; Gieselmann *et al.*, 1985 ; Capony *et al.*, 1994).

Une fraction L ne contenant que 20-30 % des lysosomes, on peut se demander si le comportement des lysosomes d'une fraction L dans un gradient de Percoll est représentatif de tous les lysosomes. Pour vérifier que le comportement des lysosomes de la fraction L est représentatif de l'ensemble de la population des lysosomes, nous avons effectué une centrifugation en gradient de Percoll, telle que décrite ci-dessus, mais en utilisant une fraction MLP, dans laquelle se trouvent 80% des lysosomes. Nous avons mesuré la densité et la distribution de l'activité de la Cathepsine C et de l' α -Glucosidase Alcaline (**fig.3.3a**, **fig.3.3b** et **3.3c**). Les résultats de cette expérience nous montrent que l'évolution de la densité dans le gradient est comparable à celle obtenue ci-dessus, ce qui montre à nouveau qu'un gradient s'est formé pendant la centrifugation. On retrouve 57.5 % de l'activité de la Cathepsine C dans la fraction la plus dense représentant les lysosomes de forte densité. Ceci nous montre que le comportement des lysosomes de la fraction L est représentatif de la majorité des lysosomes. Pour l'activité de l' α -Glucosidase Alcaline, on retrouve 97.7 % de l'activité dans les deux premières fractions, ce qui est, rappelons-le, le comportement attendu pour une enzyme résidant dans le réticulum endoplasmique. Les deux types de résultats obtenus, pour les centrifugations en gradient de Percoll d'une fraction L et d'une fraction MLP, nous indiquent clairement que nous pouvons mettre en évidence les lysosomes denses dans les cellules HepG2.

La fraction L préparée en vue de son analyse en gradient de Percoll diffère de la fraction L obtenue selon le protocole "classique" (de Duve *et al.*, 1955) de fractionnement (cf. **fig.3.1**) par le fait qu'elle a été obtenue au départ d'un homogénat réalisé dans un milieu tamponné avec de l'imidazole 3 mM (Gieselmann *et al.*, 1983). Nous nous sommes demandés si les deux méthodes de fractionnements, faits dans des milieux avec et sans imidazole, mènent à des fractions ayant une "composition" comparable. De même, pour les centrifugations en gradient de Percoll de deux fractions enrichies en lysosomes séparées par ces deux méthodes, on peut se demander si on retrouve une distribution comparable des lysosomes. Nous avons effectué deux fractionnements avec et sans imidazole 3 mM, ainsi que deux centrifugations en gradient de Percoll d'une fraction L préparée par les deux méthodes. Nous avons



N M L P S

Figure 3.4 : Comparaison de deux méthodes de fractionnement. Deux fractionnements complets ont été effectués comme décrit dans "Matériel et Méthodes" au départ d'un homogénat réalisé dans du saccharose isotonique ou dans du saccharose isotonique, 3 mM imidazole.

ASR : Activité Spécifique Relative

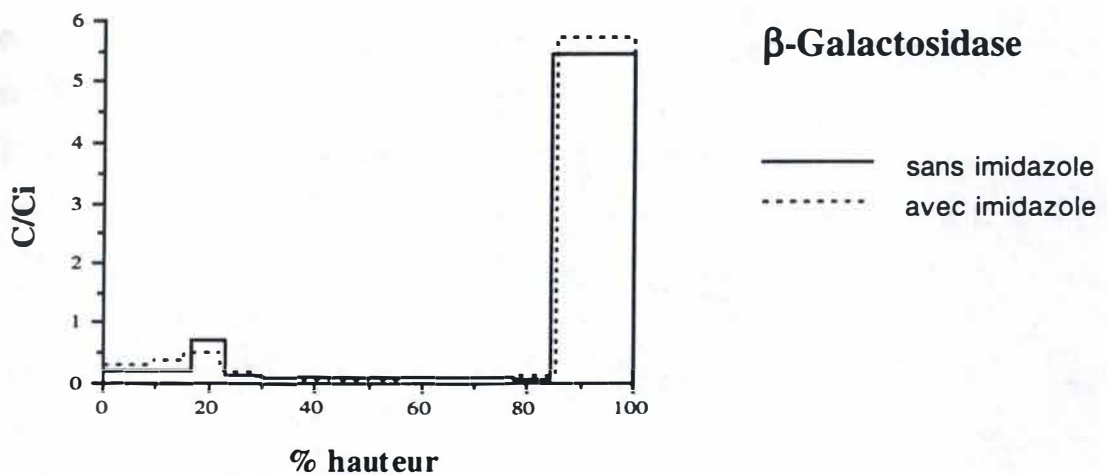


Figure 3.5 : Comparaison de deux centrifugations sur gradient de Percoll de fractions L préparées par deux méthodes de fractionner comme décrit dans la figure 3.4.

C/Ci : Concentration / Concentration initiale

ensuite mesuré les activités d'enzymes marqueurs dans les différentes fractions (fig.3.4, fig.3.5). La figure 3.4 montre les distributions de la Cathepsine C et de la β -Galactosidase. On retrouve dans la fraction L 32.8 % de l'activité de la Cathepsine C pour un fractionnement fait sans imidazole et 34.8 % lors d'une séparation faite avec imidazole. Pour la β -Galactosidase on a mesuré dans la fraction L 25.6 % et 29.5 % d'activité pour le fractionnement fait sans et avec imidazole respectivement.

Sur la figure 3.5 on observe la distribution de la β -Galactosidase après une centrifugation en gradient de Percoll d'une fraction L séparée par les deux méthodes. Nous avons trouvé 85.8 % et 85 % d'activité de l'enzyme dans la fraction dense du gradient après centrifugation de la fraction L séparée sans ou avec imidazole. On constate donc que les deux méthodes de fractionnements fournissent des résultats forts comparables, tant pour le fractionnement complet que pour le gradient de Percoll ; que l'expérience ait été réalisée au départ d'une fraction L "classique" ou isolée à partir d'un homogénat tamponné.

3.3. Biosynthèse de la Cathepsine D

Après avoir montré qu'il est possible de détecter la présence de lysosomes denses dans les cellules HepG2 dans un gradient de Percoll, nous avons continué nos travaux, avec pour but de nous intéresser au rôle hypothétique de ces organites dans la maturation de précurseurs d'hydrolases lysosomales. Nous avons choisi de nous intéresser à la Cathepsine D. Nous avons d'abord vérifié qu'il nous est possible de suivre la biosynthèse de cette protéine dans les cellules HepG2.

Nous avons décidé d'étudier cette biosynthèse en effectuant un marquage métabolique des cellules HepG2 à l'aide de Méthionine ^{35}S , suivi d'une immunoprécipitation (Hasilik and Neufeld, 1980 ; Gieselmann *et al.*, 1983) des différentes formes biosynthétiques de la Cathepsine D. Les cellules HepG2 ont été mises à jeun pendant une heure dans du milieu déficient en sérum et en méthionine. Ensuite, nous avons effectué un "pulse" de 30 minutes en incubant les cellules dans du milieu déficient contenant de la méthionine marquée au ^{35}S , suivi d'une "chasse" de durée variable dans du milieu complet, c'est à dire contenant de la méthionine froide et du sérum. Les temps de "chasse" choisis correspondent à 2, 4 et 6 heures. Pour

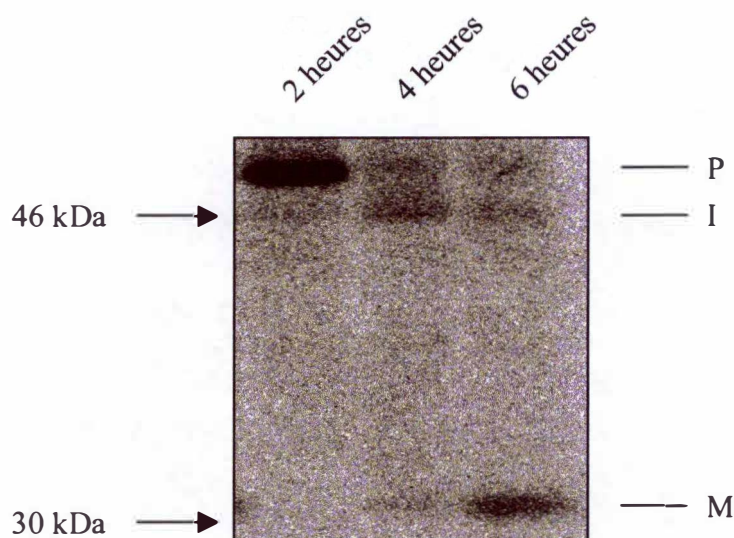


Figure 3. 6: Biosynthèse de la Cathepsine D mise en évidence par un marquage métabolique de la Cathepsine D à la méthionine ^{35}S . Des cellules HepG2 ont été mises à jeun pendant une heure dans du DMEM déficient en sérum et en méthionine. Après un pulse de 30 minutes dans du DMEM déficient contenant de la méthionine radioactive, les cellules ont subi une chasse de durée variable dans du DMEM complet. La Cathepsine D a été immunoprécipitée par l'anticorps anti-Cathepsine D humaine. (P: forme précurseur ; I: forme intermédiaire ; M: forme mature)

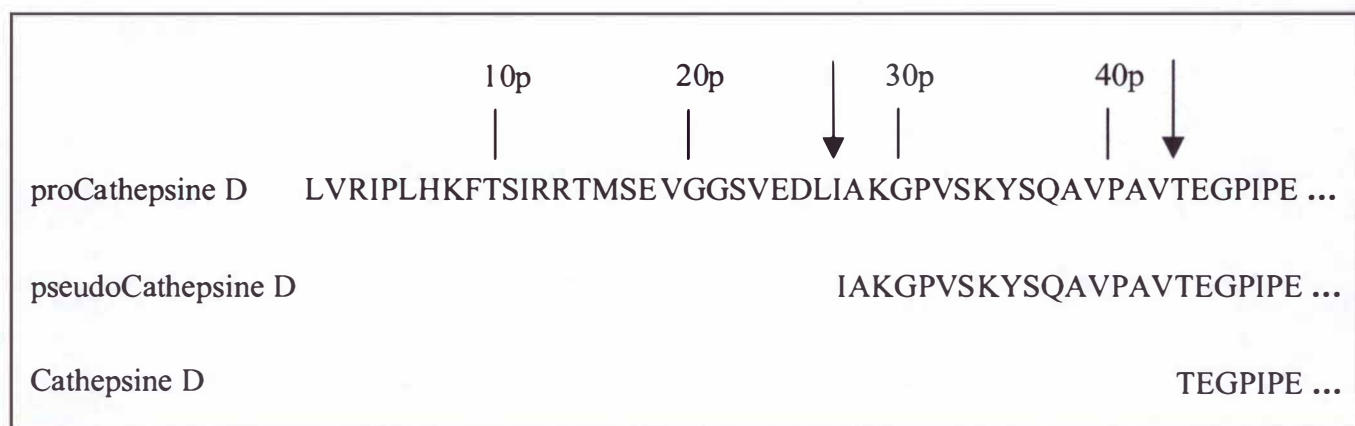


Figure 3. 7: Séquence de la Cathepsine D montrant le côté N-terminal ainsi que les deux sites de clivage menant vers les formes intermédiaire et mature (Richo and Conner 1994).

homogénéiser les cellules, du tampon de lyse a été ajouté après la "chasse". Le tampon de lyse contient des inhibiteurs de protéases qui empêchent la dégradation du contenu cellulaire. Nous avons soumis les lysats cellulaires à une immunoprécipitation par l'anticorps (AC) anti-Cathepsine D humaine. Les complexes AC-protéine formés sont fixés par la Protéine-A-Sépharose. Les échantillons issus de l'immunoprécipitation ont été soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS/PAGE). Le gel, fixé et séché a été mis sur un écran sensible aux rayons β et la révélation se fait grâce à un système "Phosphorimager" (Packard) (Hasilik and Neufeld, 1980 ; Gieselmann *et al.*, 1983) (fig.3.6).

La figure 3.6 permet de mettre en évidence trois formes de la Cathepsine D dont on peut suivre l'apparition dans le temps. Il s'agit des formes précurseur ou Procathepsine D (53 kDa), intermédiaire ou Pseudocathepsine D (47 kDa) et mature (31 kDa) (Hasilik and Neufeld, 1980). La forme précurseur est encore présente en quantité abondante après 2 heures de "chasse" et la forme intermédiaire est également détectable après 2 heures de "chasse". On observe que la forme intermédiaire augmente en quantité au cours du temps ce qui indique que de plus en plus de précurseur est clivé en forme intermédiaire quand le temps de "chasse" augmente. La forme mature devient détectable après 4 heures et après 6 heures de "chasse", elle est présente en quantité importante ce qui nous indique que le deuxième clivage menant vers la forme mature (forme lysosomale) se fait relativement tard.

La figure 3.7 montre la séquence en acides aminés du côté N-terminal ainsi que les deux sites de clivages menant successivement vers les formes intermédiaire et mature (Richo and Conner 1994).

Nous avons travaillé avec une lignée qui a subi un nombre considérable de "repiquages" et par prudence nous avons fait une comparaison entre la biosynthèse de la Cathepsine D dans nos cellules (ancienne lignée) et la biosynthèse dans des cellules nouvellement acquises à l'ATCC et n'ayant subi qu'un nombre réduit de repiquages (nouvelle lignée). Nous avons ainsi voulu nous assurer qu'au cours du temps, avec les générations successives, il n'a pas eu des "changements" dans les cellules qui pourraient affecter la biosynthèse de la Cathepsine D de façon significative. Nous avons soumis des cellules des deux lignées à 1 heure de jeûne dans du milieu déficient en sérum et en méthionine. Pour faire un "pulse" de 30 minutes, nous avons remplacé

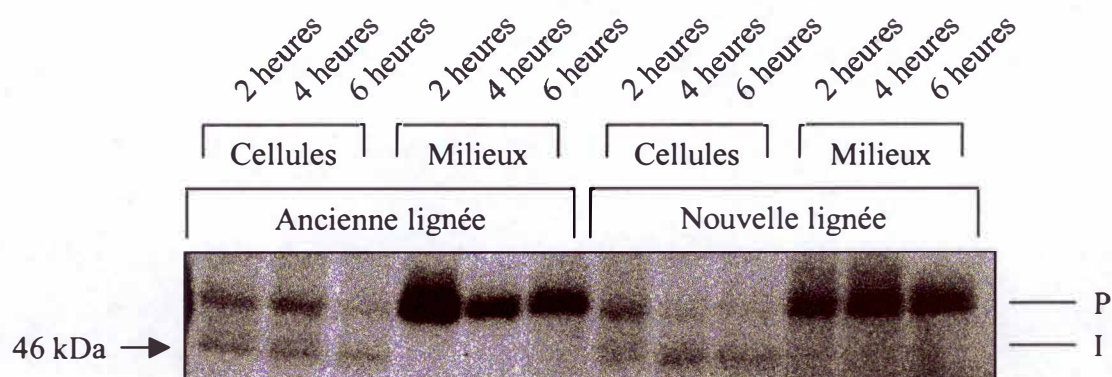


Figure 3. 8: Comparaison de deux lignées de cellules HepG2. Des cellules de deux lignées ont été mises à jeun pendant une heure et ont subi un pulse de 30 minutes dans du DMEM déficient contenant de la méthionine marquée au ^{35}S . Après une chasse de durée variable, la Cathepsine D a été immunoprécipitée par l'anticorps anti-Cathepsine D humaine.

le milieu de jeûne par le milieu de marquage contenant la méthionine marquée au ^{35}S . Nous avons effectué ensuite une "chasse" variable de 2, 4 et 6 heures dans du DMEM complet. Après, nous avons récolté les cellules et les milieux de chasse en ajoutant du tampon de lyse. Les lysats cellulaires et les milieux de "chasse" ont été immunoprécipités avec l'AC-anti Cathepsine D humaine (fig.3.8).

En observant la figure 3.8, on constate que la biosynthèse se fait dans les deux lignées d'une manière fort comparable. Tout au plus pouvons nous remarquer dans cette expérience que dans la nouvelle lignée la forme précurseur semble disparaître plus rapidement mais nous ne pouvons pas affirmer qu'il s'agit d'une différence significative. Plus important, nous voyons que les poids moléculaires des formes précurseurs et intermédiaires sont identiques. Nous n'avons malheureusement pas pu montrer l'apparition des formes matures dans cette expérience à cause d'un problème technique survenu lors de la révélation de la radioactivité sur le gel.

La figure 3.8 permet de confirmer une autre caractéristique des cellules HepG2 : elles secrètent beaucoup de précurseurs d'hydrolases lysosomales (Delbrück *et al.*, 1994, Hasilik *et al.*, 1983). L'expérience montrée à la figure 3.8 montre que les cellules sécrètent beaucoup de précurseur de la Cathepsine D. Notons que, comme décrit dans la littérature, la forme intermédiaire est exclusivement intracellulaire. En général, les cellules cancéreuses sont connues pour sécréter beaucoup de précurseur de Cathepsine D et d'autres hydrolases (Rochefort *et al.*, 1987).

En suivant la biosynthèse de la Cathepsine D, on peut s'intéresser à la deuxième étape de maturation qui se fait relativement tard et on peut se demander dans quel compartiment et sous quelles conditions se fait la transformation de la forme intermédiaire en Cathepsine D mature. Nous avons tenté d'établir la distribution des différentes formes de la Cathepsine D néosynthétisée dans les fractions d'un gradient de Percoll, en espérant trouver une indication concernant l'endroit de la cellule où a lieu cette deuxième étape de maturation. A cette fin, nous avons effectué une centrifugation sur gradient de Percoll d'une fraction L provenant de cellules marquées pour avoir des renseignements sur la présence de la Cathepsine D dans les différentes fractions. Des cellules HepG2 ont été mises à jeun pendant une heure et nous avons effectué un marquage de 4 heures en incubant les cellules en présence de méthionine marquée au ^{35}S . Nous avons choisi un temps de marquage plus élevé (4 heures) pour

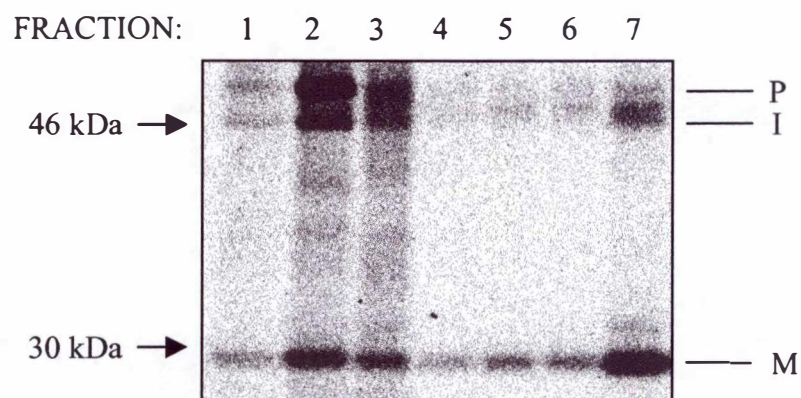


Figure 3. 9: Distribution de la Cathepsine D dans les fractions d'un gradient de Percoll. Des cellules ayant subi un marquage de 4 heures ont été homogénéisées dans du saccharose isotonique glacé. Une fraction L a été préparée et ensuite centrifugée en gradient de Percoll. La Cathepsine D a été immunoprécipitée dans les 7 fractions du gradient.

nous assurer que les trois formes de la Cathepsine D sont marquées au ^{35}S . Après le marquage, nous avons homogénéisé les cellules et séparé une fraction L enrichie en lysosomes par centrifugation différentielle. Cette fraction L a été par la suite centrifugée sur un gradient de Percoll et nous avons coupé le gradient en 7 fractions. Nous avons immunoprécipité les différentes formes de la Cathepsine D sur chacune de ces fractions et nous avons analysé les immunoprécipités par SDS/PAGE.

La figure 3.9 nous montre que le précurseur est principalement trouvé dans les fractions légères, là où est localisé le réticulum endoplasmique mais aussi le Golgi et les endosomes (Gieselmann *et al.*, 1983). La forme intermédiaire se trouve à la fois dans les fractions moins denses et dans le fond du gradient où sont localisés les lysosomes denses (cf. **fig.3.9**). La présence de la forme intermédiaire dans la fraction la plus dense (fraction 7) laisse penser que le deuxième clivage de maturation de la Cathepsine D ne s'effectue pas complètement dans un compartiment antérieur aux lysosomes denses (Rijnboutt *et al.*, 1992). Le fait qu'on retrouve principalement la forme mature dans la fraction dense, mais qu'elle apparaît aussi dans des structures plus légères, laisse penser que la maturation finale pourrait débiter dans un endosome tardif ou dans un lysosome en train de devenir dense, une hypothèse en accord avec des observations antérieures (Delbrück *et al.*, 1994 ; Gieselmann *et al.*, 1983 ; Rijnboutt *et al.*, 1992). Il faut noter que cette expérience n'a été faite que deux fois, mais le fait que ces résultats sont confirmés par d'autres chercheurs nous a menés à émettre l'hypothèse que le deuxième clivage de maturation de la Cathepsine D concerne les lysosomes denses, ou bien se fait en parallèle avec la transformation de prélysosomes légers en granules denses.

3.4. Effet du saccharose sur la biosynthèse de la Cathepsine D

En vue de tester l'hypothèse que nous venons d'émettre concernant la deuxième étape de maturation de la Cathepsine D, nous nous sommes dits qu'il serait intéressant de suivre la maturation de la Cathepsine D dans des cellules dépourvues de lysosomes denses.

On sait depuis longtemps que le saccharose est endocyté (pinocyté) par les cellules et qu'il s'accumule, n'étant pas (ou très peu) dégradé par les enzymes lysosomales.

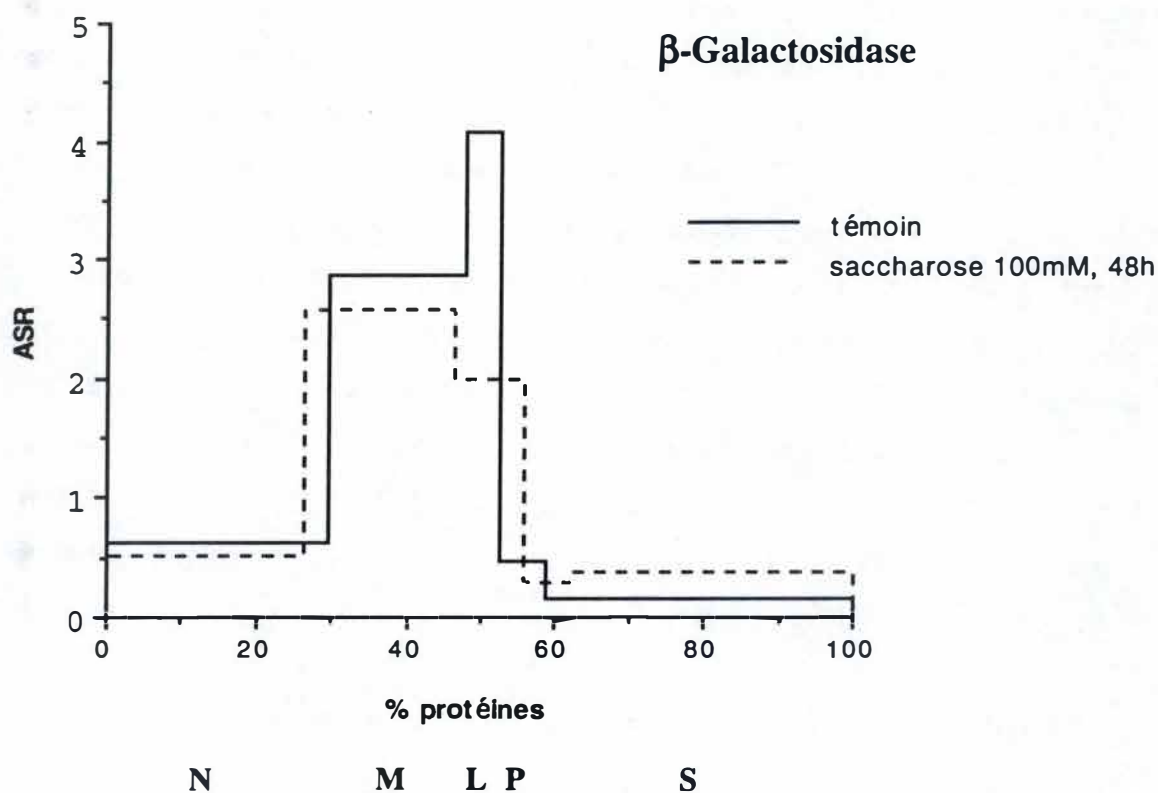
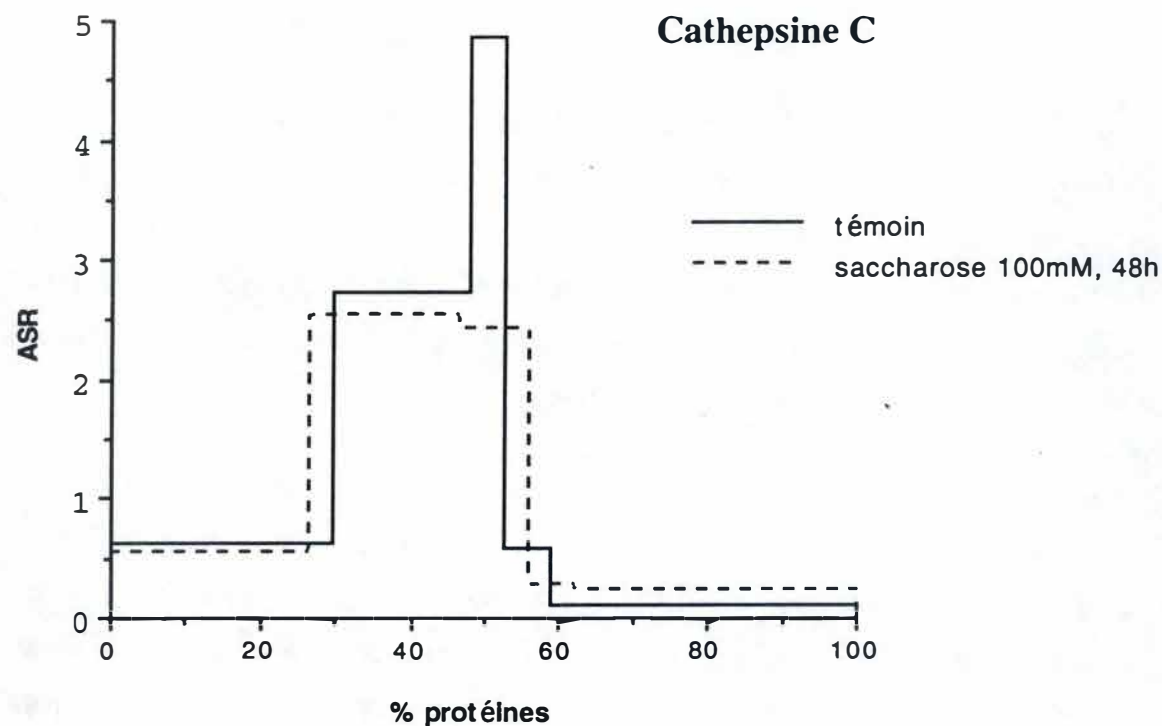


Figure 3.10 : Effet du saccharose sur un fractionnement complet de HepG2. Deux fractionnements complets ont été réalisés sur des cellules normales et des cellules incubées en présence de saccharose 100 mM pendant 48 heures. L'activité de la Cathepsine C et de la β -Galactosidase a été mesurée dans toutes les fractions.

ASR : Activité Spécifique Relative

Son accumulation dans les compartiments tardifs de la voie endocytaire provoque le gonflement de ces organites et l'apparition de "sucrosomes" (Cohn and Ehrenreich, 1969 ; de Courey and Storrie, 1991 ; Jahraus *et al.*, 1994). En présence de saccharose, on n'observe plus les lysosomes denses (Bright *et al.*, 1997). Nous avons décidé d'utiliser cette approche pour tenter de mieux connaître le rôle des lysosomes denses dans le processus de maturation de la Cathepsine D.

La première étape de cette approche a consisté à caractériser l'effet du saccharose sur les lysosomes des cellules que nous avons choisi d'utiliser, les cellules HepG2. Nous avons d'abord voulu vérifier si en présence de saccharose, nous pouvons préparer une fraction L de "composition" comparable aux fractions L utilisées précédemment et préparées à partir de cellules "témoin". Des cellules HepG2 ont été incubées pendant 48 heures avec du milieu complet contenant du saccharose à une concentration de 100 mM. Après 48 heures, les cellules ont été homogénéisées et fractionnées par centrifugation différentielle comme décrit dans "Matériel et Méthodes". En parallèle, nous avons effectué un fractionnement de cellules "témoin" ayant été incubées en absence de saccharose. Nous avons ensuite mesuré les activités de deux enzymes marqueurs des lysosomes (Cathepsine C et β -galactosidase) dans les différentes fractions (N, M, L, P et S) et la distribution des enzymes a été portée en graphique (**fig.3.10**). Les résultats obtenus pour la Cathepsine C montrent pour la fraction L provenant de cellules "témoin" une ASR de 4.9 et un pourcentage d'activité de 23.5 %. Pour les cellules incubées en présence de saccharose, nous avons trouvé dans la fraction L une ASR de 2.45 et un pourcentage d'activité de 23.1 %. L'ASR est plus élevée dans une fraction L provenant de cellules "témoin", ce qui est dû au fait que dans une fraction L "témoin" il y a un pourcentage moindre de protéines. Il est surtout important de noter qu'en choisissant d'utiliser une fraction L pour les analyses futures en gradient de densité, nous travaillons avec un échantillon de la population lysosomale de "taille" comparable, que les granules proviennent de cellules "témoin" ou de cellules incubées en présence de saccharose. Pour la distribution de la β -Galactosidase, nous avons obtenu des résultats comparables à ceux trouvés pour la Cathepsine C. Dans la fraction L des cellules "témoin", nous avons mesuré une ASR de 4.1 et un pourcentage d'activité de 19.8 %. Dans la fraction L provenant de cellules incubées en présence de saccharose nous avons calculé pour la β -Galactosidase une ASR égale à 2 et un pourcentage d'activité de 18.8 %. Nous avons décidé de comparer

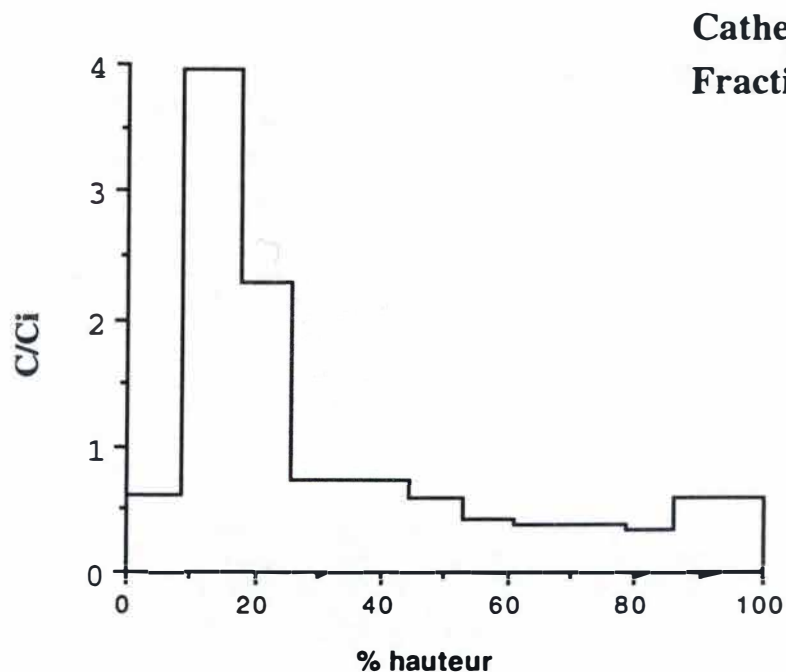


Figure 3.11 : Effet du saccharose sur un gradient de Percoll d'une fraction L. Une fraction L provenant de cellules incubées en présence de saccharose (100 mM) pendant 48 heures a été centrifugée sur gradient de Percoll et l'activité de la Cathepsine C a été mesurée dans toutes les fractions du gradient.

C/Ci : Concentration / Concentration initiale

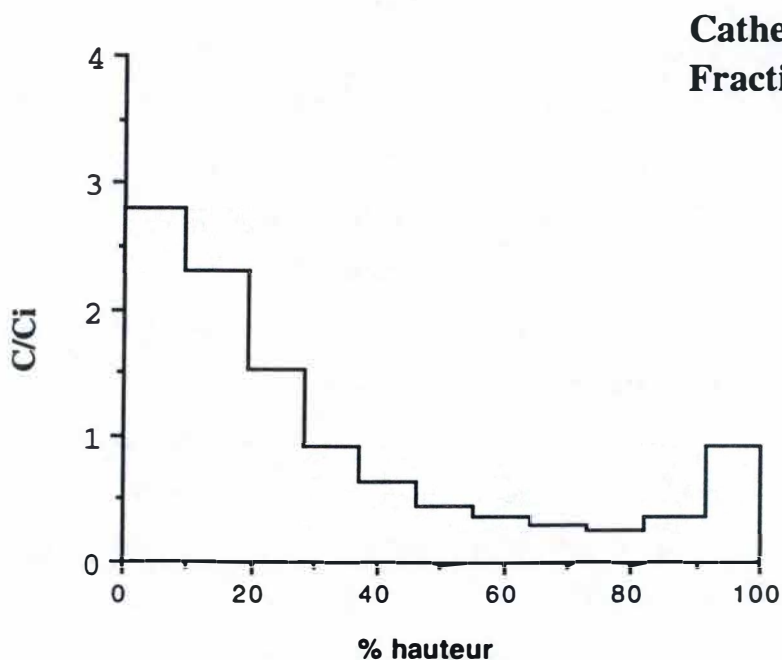


Figure 3.12 : Effet du saccharose sur un gradient de Percoll d'une fraction MLP. Une fraction MLP provenant de cellules incubées en présence de saccharose (100 mM) pendant 48 heures a été centrifugée sur gradient de Percoll et l'activité de la Cathepsine C a été mesurée dans toutes les fractions du gradient.

C/Ci : Concentration / Concentration initiale

les résultats de centrifugations en gradient de Percoll de fractions L provenant des deux types de cellules.

Pour tester l'effet du saccharose sur la formation des lysosomes denses, nous avons centrifugé en gradient de Percoll une fraction L provenant de cellules incubées en présence de saccharose (100mM) pendant 48 heures. Nous avons mesuré l'activité enzymatique de la Cathepsine C (**fig.3.11**).

60.5 % de l'activité de la Cathepsine C se retrouvent dans les trois premières fractions du gradient. Ce résultat contraste avec la distribution des lysosomes de cellules "témoin" (cf. **fig.3.2b**) qui montre 70.3 % des lysosomes dans la dernière fraction du gradient. Ce résultat spectaculaire montre que le saccharose a entraîné une diminution de la densité des lysosomes et donc, conduit à une disparition des "dense core lysosomes".

On ne sait pas exactement par quel mécanisme agit le saccharose sur les lysosomes denses. Deux hypothèses sont envisageables. Il est possible que le saccharose lors de son accumulation ait comme effet d'empêcher l'apparition des lysosomes denses (De Courrey and Storrie 1991) ou bien de provoquer leur disparition (Bright *et al.*, 1997), du fait d'un déséquilibre osmotique progressif, d'un appel d'eau dans les lysosomes et donc d'un gonflement de ces granules. Une autre possibilité est que le saccharose en s'accumulant dans les lysosomes "légers" empêche leur transformation (maturation) en structures denses (Bright *et al.*, 1997). Cette hypothèse a été émise par Bright *et al.* (1997) pour interpréter les résultats d'une étude basée sur l'utilisation de techniques morphologiques (immunomarquage à l'or colloïdal). Le modèle proposé par ces auteurs est le suivant : des structures prélysosomales légères, appelées par ces auteurs "hybrid organelles" constitueraient le compartiment "actif" dans la dégradation lysosomale. Le processus hydrolytique s'y déroulerait en parallèle avec une "maturation" progressive vers un organe de plus en plus dense. Le "dense core lysosome" serait formé de cette façon et représenterait dans la cellule un compartiment "inactif" d'un point de vue hydrolytique. Son rôle serait de servir de "réservoir" à hydrolases, transférées par fusion vers les endosomes chargés de substrats à hydrolyser. L'apport d'hydrolases provenant des "dense core lysosomes" dans les endosomes transformerait ceux-ci en organelles hybrides, sorte de lysosomes actifs.

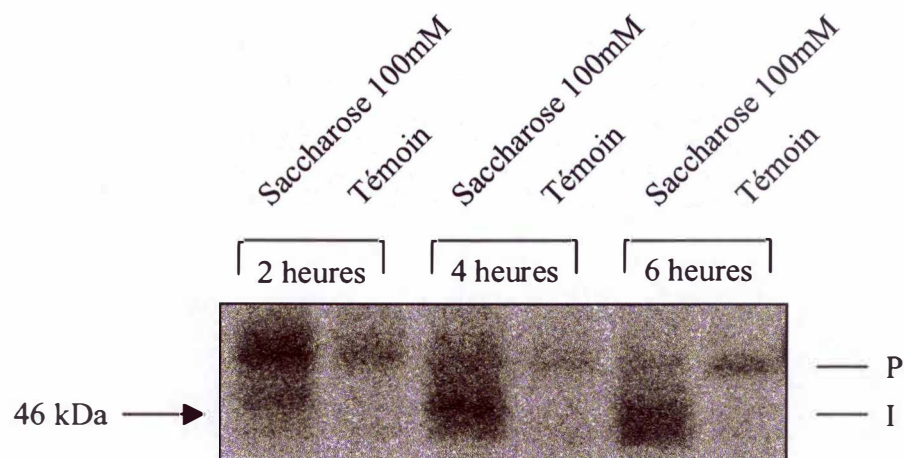


Figure 3. 13: Effet du saccharose sur la biosynthèse de la Cathepsine D. Des cellules HepG2 témoin et des cellules ayant été incubées pendant 48 heures en présence de saccharose 100 mM ont été marquées à la méthionine ^{35}S . Les cellules ont été lysées et la Cathepsine D a été immunoprécipitée par l'anticorps anti-Cathepsine D humaine.

Dans ce processus, la présence de saccharose aurait pour effet de faire disparaître les lysosomes denses en inhibant le processus de maturation des organelles hybrides.

Nous avons tenté de savoir dans quelle mesure la disparition des lysosomes denses sous l'effet du saccharose concerne toute la population lysosomale. Nous avons centrifugé en gradient de Percoll une fraction MLP provenant de cellules HepG2 incubées pendant 48 heures en présence de saccharose (100 mM). Rappelons qu'une fraction MLP renferme au moins 80 % des hydrolases lysosomales. La figure 3.12 montre la distribution de la Cathepsine C dans les fractions du gradient de Percoll. On retrouve 63 % de l'activité de l'enzyme dans les trois premières fractions du gradient. Ce résultat montre bien que l'effet du saccharose concerne tous les lysosomes.

Le saccharose constitue donc bien, dans ces cellules HepG2, un moyen de faire "disparaître" les lysosomes denses et donc, peut être un moyen d'étudier l'importance de ces granules dans le processus de maturation des hydrolases néosynthétisées. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet du saccharose sur la maturation de la Cathepsine D. Pour tester cet effet sur la biosynthèse, nous avons effectué un marquage métabolique de cellules HepG2 "témoin" et de cellules incubées en présence de saccharose 100 mM pendant 48 heures. Les cellules, "témoin" et incubées en présence de saccharose, ont été mises à jeun pendant une heure dans du milieu déficient. Nous avons soumis les cellules à un "pulse" de 30 minutes dans du milieu déficient contenant de la méthionine marquée au ^{35}S . Après une période de "chasse" variable (2, 4, et 6 heures) nous avons récolté et lysé les cellules. Les lysats cellulaires ont été soumis à une immunoprécipitation à l'aide de l'AC-anti Cathepsine D humaine. Pour séparer les trois formes de la Cathepsine D, nous avons effectué une électrophorèse en présence de SDS (fig.3.13).

Qu'il s'agisse des cellules "témoin" ou des cellules ayant subi une surcharge de saccharose, on constate que la forme précurseur de la Cathepsine D est toujours visible après 6 heures de chasse. Nous avons obtenu un résultat comparable lors du marquage métabolique décrit dans la figure 3.6. La forme intermédiaire est peu visible dans les cellules "témoin". La "visibilité" de cette molécule varie d'une expérience à l'autre, un résultat qui s'explique peut-être par son caractère "transitoire". L'observation la plus intéressante concerne les cellules préincubées en présence de saccharose. En effet, dans cette même expérience (cellules "témoin" et cellules chargées de saccharose ont

été traitées en parallèle), on note une réelle accumulation de forme intermédiaire lorsque le saccharose est présent. Après 4 et 6 heures de "chasse" on observe une accumulation importante de forme intermédiaire. Ceci nous a amenés à penser que dans les cellules ayant été incubées en présence de saccharose, la deuxième étape de maturation de la Cathepsin D est peut-être ralentie ou même inhibée et donc, que le saccharose pourrait exercer un effet sur la maturation finale de la Cathepsine D. Ce résultat est confirmé par plusieurs expériences du même type réalisées au laboratoire (résultats non montrés). Une autre caractéristique que nous avons pu remarquer en travaillant avec des cellules chargées de saccharose est que le saccharose semble stimuler la synthèse de la Cathepsine D. Cette observation n'est peut-être pas surprenante. Cet effet a également été démontré pour l'expression de *lamp-1* dont la transcription semble stimulée en présence de saccharose (Isaac *et al.*, 2000).

3.5. Maturation *in vitro* de la Cathepsine D

Nous venons de voir que le saccharose a un effet très marqué, tant sur la présence des lysosomes denses que sur la biosynthèse de la Cathepsine D. Ceci nous conforte dans notre hypothèse qu'il pourrait y avoir une relation entre la formation des lysosomes denses et la transformation de la forme intermédiaire de la Cathepsine D en forme mature. Afin d'étudier cette question plus en détail, nous avons tenté de reproduire *in vitro* la maturation de la Cathepsine D néosynthétisée dans un système plus facilement manipulable. Nous nous sommes basés pour ce faire sur la méthode décrite par Gieselmann *et al.* (1985).

Des cellules HepG2 ont été mises à jeun pendant une heure dans du milieu déficient en méthionine et en sérum. Nous avons ensuite effectué un "pulse" de 30 minutes dans du milieu déficient contenant de la méthionine marquée (^{35}S) et soumis ensuite les cellules à une "chasse" de 90 minutes dans du milieu complet. La raison pour laquelle nous avons choisi un temps de "chasse" de 90 minutes est la suivante : nous devons choisir un temps pour lequel la "vague" de Cathepsine D radioactive a déjà atteint le compartiment endo-lysosomal, mais qui soit suffisamment court pour que les molécules soient encore en grande partie sous forme précurseur (non mature). Après la "chasse", les cellules ont été homogénéisées et fractionnées par centrifugation différentielle pour préparer une fraction L enrichie en lysosomes. La fraction L a été

incubée pendant trois heures dans cinq conditions différentes (cf. plus loin), et ceci dans un milieu dont l'isotonicité était assurée par un tampon phosphate à pH 7.2. Après trois heures d'incubation *in vitro*, on a arrêté la "maturation" en ajoutant du tampon de lyse. Nous avons par la suite immunoprécipité les cinq échantillons avec l'AC-anti Cathepsine D humaine.

Les cinq conditions différentes dans lesquelles nous avons incubé les granules des fractions L et MLP sont les suivantes :

1. Incubation à 4°C dans du milieu tamponné : cet échantillon sert de "témoin". Il est censé nous donner un image du point de départ, c'est-à-dire de la proportion des différentes formes présentes après 90 minutes de "chasse" mais avant l'éventuelle maturation *in vitro*.
2. Incubation à 37°C dans du milieu tamponné : cette incubation devrait nous montrer dans quelle mesure une maturation de la Cathepsine D peut se produire à 37°C dans un milieu isotonique, avec des lysosomes n'ayant subi aucun traitement particulier.
3. Incubation à 37°C dans du milieu tamponné contenant de l'ATP 3 mM : cette incubation sert à vérifier si l'ajout d'ATP a un effet sur la maturation de l'hydrolase. La maturation de la Cathepsine D, comme celle d'autres hydrolases lysosomales, est un processus protéolytique dépendant du pH (Gieselmann *et al.*, 1985 ; Richo and Conner, 1994). Le pH des lysosomes est maintenu dans la gamme acide (4.5-5.5) grâce au fonctionnement d'une pompe à protons ATP dépendante (Ohkuma *et al.*, 1982). On peut donc espérer, par incubation des granules en présence d'ATP, stimuler le fonctionnement de l'ATPase pompe à protons et dès lors l'acidification des lysosomes.
4. Incubation à 37°C dans du milieu tamponné contenant de l'ATP 3 mM et du DTT 0.5 mM. Cette condition est identique à la précédente mais dans un système où on ajoute un agent réducteur au milieu, on peut espérer ralentir l'oxydation *in vitro* de composants membranaires.
5. Incubation à 37°C dans du milieu tamponné contenant de l'ATP 3 mM, du DTT 0.5 mM et du Triton X-100 0.5 %. Il s'agit en quelque sorte d'un contrôle négatif visant à confirmer que l'éventuelle maturation observable dans les conditions 2, 3 et 4 représente bien un processus se déroulant au sein d'organites intacts. La

Fraction	Témoin 4°C	Témoin 37°C	+ATP	+ATP+ DTT	+ATP+DTT +Triton
Latence (%)	88.3	92.6	94.2	94	0

Tableau 3.1a : Latence de la Cathepsine C mesurée sur une maturation *in vitro* d’une fraction L. Une fraction L enrichie en lysosomes a été séparée en centrifugation différentielle. Cette fraction L a été incubée pendant trois heures dans les conditions indiquées ci-dessus. A la fin de l’incubation les activités libre et totale ont été mesurées dans les cinq échantillons.

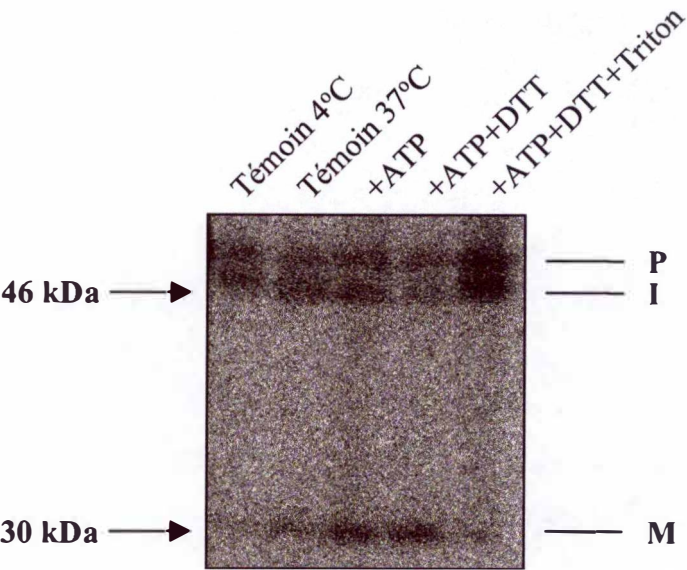


Figure 3. 14a : Maturation *in vitro* d’une fraction L. Une fraction L provenant de cellules HepG2 marquées au ³⁵S a été préparée par centrifugation différentielle. Cette fraction a été incubée pendant trois heures dans un milieu isotonique en phosphate (pH 7.2) dans les cinq conditions décrites ci-dessus. La Cathepsine D a été immunoprécipitée par l’anticorps anti-Cathepsine D humaine.

Fraction	Témoin 4°C	Témoin 37°C	+ATP	+ATP+ DTT	+ATP+DTT +Triton
Forme mature (% total)	8.3 %	19.6 %	31.2 %	37.2 %	2.1 %

Tableau 3.2a : Quantification relative de la Cathepsine D des résultats présentés à la figure 3.14a.

rupture de leur membrane sous l'effet du détergent Triton X-100 devrait dans ces conditions bloquer toute possibilité de maturation.

Pour chaque test, peu de temps (± 15 minutes) avant d'arrêter la maturation, nous avons mesuré les activités libre et totale de la cathepsine C pour mesurer la latence de l'enzyme marqueur des lysosomes. La latence (le masquage) de l'enzyme permet de se faire une idée de l'état dans lequel se trouvent les granules. Elle se calcule en retirant l'activité libre (exprimée en % d'activité totale) de l'activité totale (égale à 100 %). Une latence supérieure à 80 % caractérise une fraction contenant des granules relativement intacts. Le tableau 3.1a montre les latences mesurées après trois heures d'incubation *in vitro* d'une fraction L de cellules HepG2 dans les cinq conditions décrites ci-dessus. Les résultats nous confirment que les tube 1 à 4 contiennent des granules dans un état de préservation de leur membrane tel que, si la présence d'une membrane imperméable est une condition nécessaire à la maturation *in vitro*, cette maturation devrait se dérouler de manière optimale. Dans le tube contenant le Triton, on observe bien sûr une perte totale de latence, c'est-à-dire une activité libre égale à l'activité totale.

La figure 3.14a montre la maturation *in vitro* de la Cathepsine D provenant d'une fraction L préparée après 10 minutes de "pulse" et 90 minutes de "chasse". Le tableau 3.2a résume une quantification des pourcentages des trois formes de Cathepsine D obtenues dans les 5 conditions :

1. À 4°C la maturation se fait très mal ; on retrouve 8.3 % de forme mature (par rapport à la somme des trois formes détectées dans les mêmes conditions).
2. On constate que l'élévation de température à 37°C conduit à une maturation de la Cathepsine D traduite par l'apparition de forme mature en quantité plus importante. On passe de 8.3 à 19.6 % de forme mature dans cette expérience.
3. En ajoutant de l'ATP, nous avons obtenu nettement plus de Cathepsine D mature formée pendant ces trois heures *in vitro*. La forme mature représente ici 31.2 % de la Cathepsine D totale.
4. L'ajout de DTT en plus de l'ATP n'améliore pas fortement la maturation. 37.2 % de forme mature sont retrouvées dans ces conditions.
5. Comme on peut s'y attendre, en ajoutant du Triton X-100 au milieu de maturation nous avons obtenu très peu de forme mature (2.1 %). Ce résultat important

Fraction	Témoin 4°C	Témoin 37°C	+ATP	+ATP+ DTT	+ATP+DTT +Triton
Latence (%)	82.2	83.4	87.3	88.1	0

Tableau 3.1b : Latence de la Cathepsine C mesurée sur une maturation *in vitro* d’une fraction MLP. Une fraction MLP enrichie en lysosomes a été séparée par centrifugation différentielle et incubée pendant trois heures dans les cinq conditions indiquées. A la fin de l’incubation les activités libre et totale ont été mesurées dans les cinq échantillons.

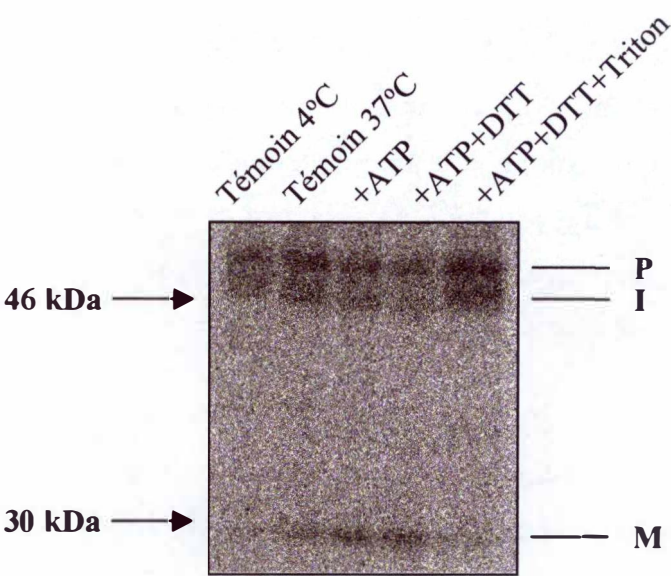


Figure 3. 14b : Maturation *in vitro* d’une fraction MLP. Une fraction MLP provenant de cellules HepG2 marquées à la méthionine ³⁵S a été préparée par centrifugation différentielle et incubée pendant trois heures dans un milieu isotonique en phosphate (pH 7.2) dans les cinq conditions indiquées. La Cathepsine D a été immunoprécipitée par l’anticorps anti-Cathepsine D.

Fraction	Témoin 4°C	Témoin 37°C	+ATP	+ATP+ DTT	+ATP+DTT +Triton
Forme mature (% total)	6.4 %	16 %	26.4 %	28.4 %	7.4 %

Tableau 3.2b : Quantification relative de la Cathepsine D des résultats présentés à la figure 3.14b.

confirme que la maturation *in vitro* observée dans les conditions 2, 3 et 4 résulte d'un processus intralysosomal.

Ces résultats indiquent donc qu'à 37°C la maturation *in vitro* peut se faire. L'effet de l'ATP pourrait s'expliquer par le fait que l'ATP stimule l'activité de l'ATPase pompe à protons dans la membrane des organites. L'acidification qui en résulte favoriserait la deuxième étape de maturation de la Cathepsine D. En ajoutant en plus de l'ATP, du DTT on obtient une légère augmentation de la quantité de forme mature (37.2 %). Le fait que l'ajout de DTT ne stimule pas fortement la maturation complète de la Cathepsine s'explique peut-être par le fait que nous avons travaillé avec du "matériel" frais. L'effet du Triton (2.1 %) nous indique que la deuxième étape de maturation de la Cathepsine D nécessite la présence d'organites intacts. Notons que ce type d'expérience a été réalisé plusieurs fois au laboratoire (résultats non montrés).

Nous avons effectué une expérience de maturation *in vitro* dans les mêmes conditions sur une fraction MLP, renfermant la majorité des lysosomes. Peu de temps (± 15 minutes) avant d'arrêter la maturation par le tampon de lyse, nous avons mesuré les activités libres et totales de la Cathepsine C pour calculer la latence de l'enzyme marqueur dans les cinq échantillons (**tab.3.1b**). On constate que pour les échantillons 1 à 4, les granules sont intacts, ce qui permet une maturation optimale de l'hydrolase.

La figure **3.14b** et le tableau **3.2b** montrent les résultats obtenus pour la maturation *in vitro* de la Cathepsine D provenant d'une fraction MLP. Ces résultats sont fort proches de ceux obtenus avec la fraction L et décrits dans la figure **3.14a** et le tableau **3.2a** :

1. On constate qu'à 4°C la maturation se fait également mal (6.4 % de forme mature).
2. À 37°C nous avons obtenu 16 % de forme mature de la Cathepsine D ce qui montre à nouveau qu'il est possible de faire "maturer" l'enzyme à 37°C *in vitro*.
3. En ajoutant de l'ATP à 37°C, la quantité de forme mature retrouvée est de 26.4 %. Cet effet de l'ATP (donc vraisemblablement de l'acidification) confirme le résultat obtenu pour la fraction L.
4. À nouveau, le fait d'ajouter du DTT ne semble pas favoriser beaucoup la maturation de la Cathepsine D (28.4 % de forme mature).

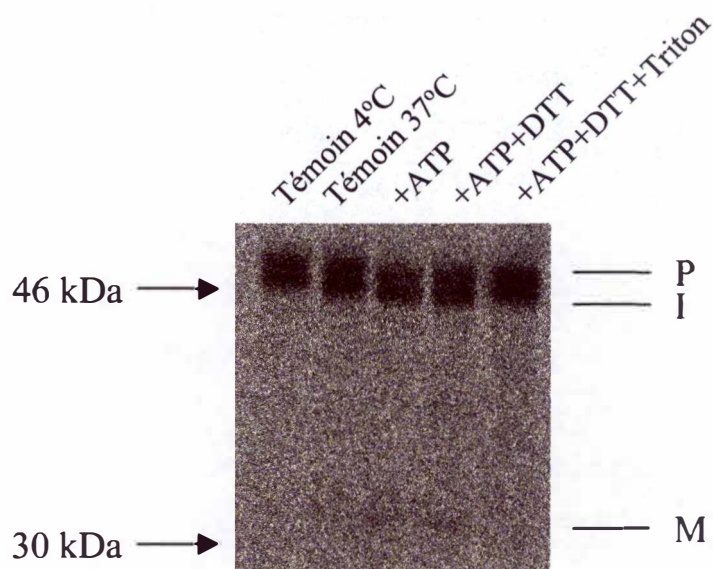


Figure 3. 15: Effet du saccharose sur la maturation *in vitro* d'une fraction L. Une fraction L provenant de cellules ayant été incubées pendant 48 heures en présence de saccharose 100 mM a été incubée pendant trois heures. Le milieu de maturation est un milieu isotonique en phosphate (pH 7.2) et la maturation se fait dans les cinq conditions indiquées.

Fraction	Témoin 4°C	Témoin 37°C	+ATP	+ATP +DTT	+ATP +DTT +Triton
Latence (%)	71.5±3.8	81±5.5	89.5±0.5	90.7±1.6	6±1.5

Tableau 3.3 : Moyennes des latences de la Cathepsine C pour plusieurs maturations *in vitro* de fractions L provenant de cellules incubées en présence de saccharose (100 mM) pendant 48 heures. Des fractions L provenat de cellules chargées de saccharose ont été incubées pendant trois heures dans les cinq conditions indiquées. A la fin de l'incubation la latence de la Cathepsine C a été mesurée dans tous les échantillons.

5. Comme nous l'avons observé précédemment, l'ajout de Triton X-100 empêche toute maturation de la Cathepsine D et démontre que la transformation protéolytique ne peut pas se dérouler efficacement en dehors de l'organite.

La maturation *in vitro* de la Cathepsine D effectuée sur une fraction MLP nous montre à nouveau que les lysosomes de la fraction L ont un comportement représentatif de l'ensemble des lysosomes.

3.6. Effet du saccharose sur la maturation *in vitro* de la Cathepsine D

Nous avons utilisé ce protocole expérimental de maturation *in vitro* pour étudier l'effet de saccharose endocyté sur la transformation protéolytique de la Cathepsine D. Nous avons donc effectué une maturation *in vitro* sur une fraction L provenant de cellules incubées en présence de saccharose pour avoir plus de renseignements sur le mode d'action du saccharose.

Des cellules HepG2 témoin et des cellules qui ont été incubées en présence de saccharose 100 mM pendant 48 heures ont été soumises à un marquage métabolique au ^{35}S pour marquer la Cathepsine D. Nous avons utilisé les conditions décrites précédemment, c'est-à-dire 30 minutes de "pulse" et 90 minutes de "chasse". Nous avons séparé une fraction L que nous avons incubée pendant trois heures dans un milieu dont l'isotonicité est assurée par un tampon phosphate (pH 7.2) et ceci dans les cinq conditions décrites plus haut.

La figure 3.15 montre le résultat d'une maturation *in vitro* réalisée à partir d'une fraction L provenant de cellules ayant été incubées en présence de saccharose (100 mM, 48 heures) :

1. Trois heures d'incubation à 4°C ne conduisent pas à l'obtention de forme mature.
2. Plus intéressant, on constate qu'à 37°C la maturation est très peu efficace. La forme intermédiaire, fort visible dans ces conditions, ne se transforme pas en Cathepsine D de 31 kDa.
3. Le fait d'ajouter, en présence de saccharose, de l'ATP au milieu de maturation n'augmente pas la quantité de forme mature retrouvée, contrairement à ce que nous avons observé pour la maturation *in vitro* sur des cellules témoin.
4. En ajoutant du DTT, la maturation ne semble pas se faire non plus.

Le tableau 3.3 montre des moyennes de latence (et déviations) de la Cathepsine C, calculées pour plusieurs maturations *in vitro* faites sur des fractions L provenant de cellules incubées en présence de saccharose. Ces latences ont été mesurées dans le milieu de maturation avant la fin de l'incubation. Elles montrent que le saccharose n'a pas d'effet majeur sur l'intégrité des granules, ce qui nous permet de dire que les effets observés sont dûs au saccharose, et non à la destruction d'organites devenus sensibles pendant l'incubation *in vitro*.

Les maturations *in vitro* réalisées à partir de cellules incubées en présence de saccharose doivent être répétées, mais le résultat obtenu est en accord avec les observations faites sur des cellules entières, montrées précédemment (cf. fig.3.13). Ils semblent indiquer que la présence de saccharose dans le compartiment endolysosomal perturbe de façon nette la transformation de la Cathepsine D, et en particulier la deuxième étape de maturation, qui transforme la Pseudocathepsine D ou forme intermédiaire de 47 kDa en forme mature (31 kDa).

Comme Bright *et al.* (1997) et Schmid *et al.* (1999) l'avaient montré précédemment, nos résultats démontrent que l'endocytose de saccharose par les cellules HepG2 conduit à une disparition des lysosomes denses. Nos résultats montrent que la maturation terminale de la Cathepsine D est abolie lorsque le saccharose est présent dans le compartiment endolysosomal. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer un tel effet du saccharose. On pourrait imaginer que la présence du saccharose empêche la transformation des organites hybrides en lysosomes denses, et que la formation des lysosomes denses par un phénomène d'agrégation intralysosomal, est une condition pour que se réalise le clivage de la forme intermédiaire de la Cathepsine D. Cette hypothèse attribuerait pour la première fois un rôle "fonctionnel" à la "matrice" lysosomale. Il existe toutefois d'autres possibilités pour expliquer l'effet du saccharose sur la biosynthèse. On ne peut pas exclure que le saccharose n'agisse "que" par un effet de dilution. En effet, le gonflement osmotique provoqué par l'accumulation de cette molécule résistante à l'hydrolyse pourrait conduire à la "dilution" du contenu lysosomal et freiner par conséquent la protéolyse de la Cathepsine D. Cette hypothèse nous paraît toutefois peu probable. Des expériences réalisées au laboratoire montrent que dans les cellules HepG2, le gonflement des

Courbe d'étalonnage sur une solution de FD

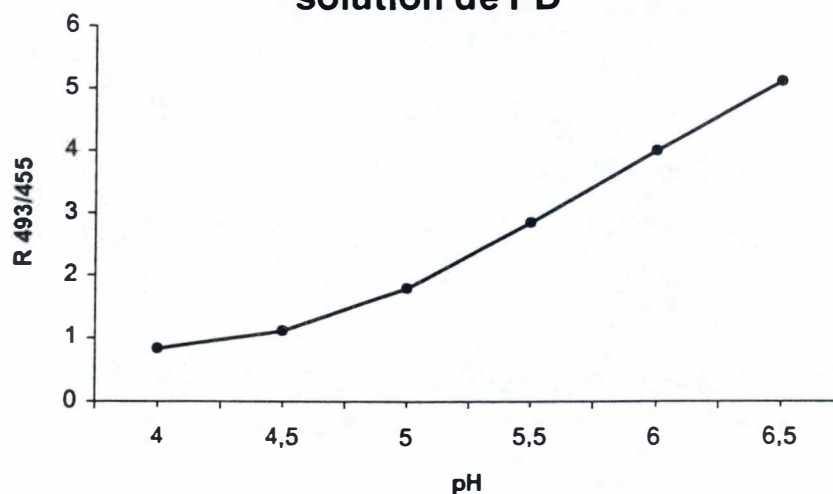


Figure 3.16 : Courbe d'étalonnage sur une solution de FD. Une solution de FD (7.5 $\mu\text{g/ml}$) a été mise à pH variable par du tampon acétate 50 mM. La fluorescence a été mesurée en utilisant une longueur d'onde d'émission de 517 nm et une excitation à 493 et à 455 nm. Nous avons calculé le rapport des fluorescences émises pour chaque pH aux deux longueurs d'ondes d'excitation pour construire la courbe d'étalonnage (Ohkuma and Poole, 1978).

granules sous l'effet du saccharose doit être fort modéré puisqu'il ne conduit pas à une modification marquée de la taille des granules (résultats non montrés).

Une troisième hypothèse est basée sur un effet "pH". L'accumulation du saccharose dans les endolysosomes pourrait avoir comme conséquence d'inhiber l'ATPase pompe à protons des lysosomes (Schmid *et al.*, 1999). La conséquence serait une augmentation du pH intralysosomal. Il se pourrait qu'un pH acide soit nécessaire pour l'activité enzymatique de la protéase clivant la forme intermédiaire en Cathepsine D mature ou bien à l'autoactivation de la Cathepsine D (Richo and Conner, 1994).

Notons que ces hypothèses ne sont pas exclusives, il se pourrait par exemple que l'acidification des lysosomes soit une condition pour la formation de lysosomes matures (Schmid *et al.*, 1999) qui, eux, seraient nécessaires à la maturation finale de la Cathepsine D.

Nous avons tenté d'en savoir plus, en essayant de mesurer l'effet éventuel du saccharose sur le pH intralysosomal. Nous avons effectué une estimation du pH intralysosomal en nous basant sur un protocole expérimental de Ohkuma and Poole, (1978) adapté par Schmid *et al.* (1999). La mesure se fait en utilisant la Fluoresceine isothiocyanate couplée au dextran (FD) dont les propriétés fluorescentes dépendent du pH. Le FD est endocyté par les cellules et aboutit dans le compartiment lysosomal où il s'accumule sans subir de dégradation. La fluorescence émise par la molécule excitée varie en fonction du pH dans les lysosomes. On peut donc déterminer le pH lysosomal en comparant la fluorescence de la molécule endocytée à une courbe d'étalonnage établie en plaçant le FD dans différentes conditions de pH.

En nous référant au protocole originel (Okhuma and Poole, 1978), nous avons établi une courbe d'étalonnage de la fluorescence sur une solution de FD (7.5 µg/ml) contenant du tampon acétate 50 mM à pH variable. La figure 3.16 montre la courbe d'étalonnage établie avec des longueurs d'ondes (excitation et émission) que nous avons optimisées en mesurant le spectre de fluorescence du FD (7.5 µg/ml) (nous avons mesuré une émission maximale à 517 nm et une excitation maximale à 493 nm en milieu basique et à 455 nm en milieu acide). Elle montre comme décrit par Okhuma and Poole (1978) une évolution très nette du rapport des lectures réalisées à 493 et 455, en fonction du pH. Pour mesurer le pH intralysosomal, nous avons incubé des cellules

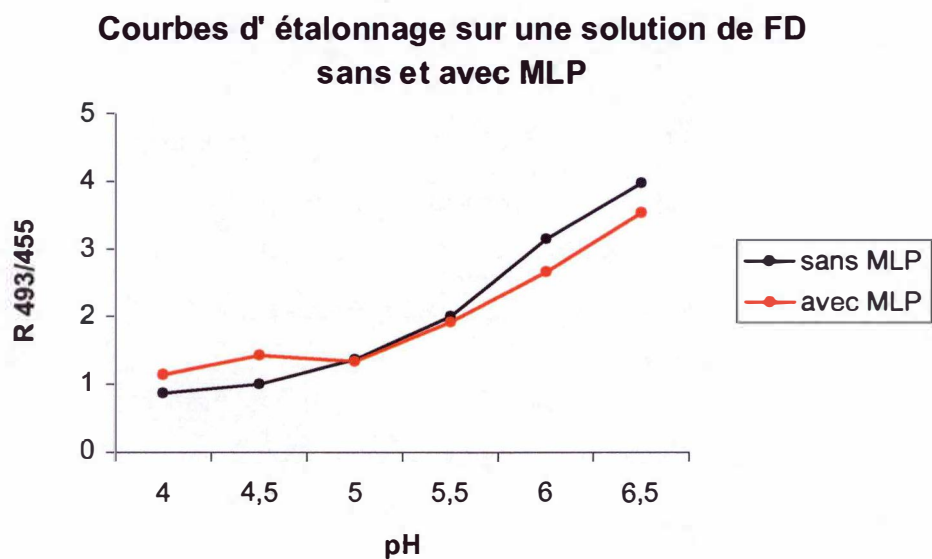


Figure 3.17 : Courbes d'étalonnage établies sur une solution de FD sans et avec MLP. Une fraction MLP provenant de cellules témoin a été ajoutée à une solution de FD 7.5 $\mu\text{g/ml}$ et la fluorescence a été mesurée en absence et en présence de MLP, à une émission de 517 nm et à des excitations de 493 et 455 nm.

HepG2 en présence de FD (1.5 mg/ml) pendant 24 heures. Après incubation, les cellules ont été récoltées et fractionnées. En nous référant à la courbe d'étalonnage, nous avons tenté de mesurer le pH intralysosomal. Nous avons mesuré un pH intralysosomal valant respectivement 5.2 et 5.4 selon qu'une fraction L ou MLP est utilisée.

En observant ces résultats, on peut se demander si l'autofluorescence du matériel biologique (L et MLP) pourrait interférer avec la mesure du pH. Pour avoir plus de renseignements sur cette question nous avons réalisé une courbe d'étalonnage sur une solution de FD comme décrit ci-dessus mais en prenant soin d'ajouter une fraction MLP provenant de cellules "témoin" (fig. 3.17). L'effet de la présence de la fraction MLP sur la courbe d'étalonnage est peu marqué. Ce résultat est en accord avec ce qui avait été décrit par Ohkuma and Poole (1978).

Pour obtenir de premiers renseignements sur l'effet éventuel du saccharose sur le pH des lysosomes, nous avons tenté de mesurer le pH intralysosomal sur des fractions L et MLP provenant de cellules normales et de cellules incubées en présence de saccharose (100 mM) pendant 48 heures. Pour les cellules normales nous avons mesuré par la technique décrite ci-dessus, un pH intralysosomal de 5 et 5.4 pour une fraction L et MLP. Pour les cellules incubées en présence de saccharose nous avons mesuré un pH de 5.2 et 5.4 pour L et MLP. Vu ces résultats, on pourrait croire que le saccharose est sans effet sur le pH des lysosomes, ce qui n'est pas en accord avec ce qui a été proposé par Montgomery *et al.* (1991). Il est certainement trop tôt pour tirer des conclusions concernant le pH intralysosomal dans des cellules incubées en présence de saccharose. Il est possible que l'absence d'effet sur le pH soit lié au type cellulaire. Il faut noter que les cellules HepG2 ne présentent jamais de vacuoles visibles en contraste de phase lors de leur incubation en présence de saccharose, et ce contrairement aux macrophages utilisés par Montgomery *et al.* (1991).

Il convient d'être très prudent avec l'interprétation de nos mesures du pH dont la mise au point n'est pas terminée. Il serait essentiel de réaliser des mesures de pH sur des cellules incubées en présence d'un inhibiteur de l'ATPase lysosomal, comme la bafilomycine A (Yoshimori *et al.*, 1991), pour nous assurer que notre test donne des résultats fiables.

Conclusions et Perspectives

4. Conclusions et Perspectives

Nos travaux ont été initiés par les publications traitant un phénomène d'agrégation d'enzymes lysosomales (Buckmaster *et al.*, 1988 ; Jadot *et al.*, 1996 ; Jadot *et al.*, 1997). Ces articles posent la question de l'existence d'une "matrice" insoluble organisant le contenu enzymatique des lysosomes. Parmi les fonctions hypothétiques qu'on peut attribuer à cette "matrice", nous avons retenu la maturation protéolytique de précurseurs d'hydrolases lysosomales, ce qui nous a conduit à suivre la biosynthèse de la Cathepsine D.

Par ailleurs, les "dense core lysosomes" ont été mis en évidence lors d'études traitant la biosynthèse d'hydrolases lysosomales (Capony *et al.*, 1994 ; Gieselmann *et al.*, 1983 ; Gieselmann *et al.*, 1985). Il en découle que l'agrégation des enzymes lysosomales pourrait être un processus qui se déroule avant ou pendant la formation des lysosomes denses (Buckmaster *et al.*, 1988, Reaves *et al.*, 1998). Dans un premier temps, nous avons pu montrer que le comportement des lysosomes lors d'une centrifugation en gradient de densité de Percoll, reflète la présence de "dense core lysosomes" dans les cellules HepG2. Ce résultat nous a encouragé à nous intéresser à la biosynthèse de la Cathepsine D dans les cellules HepG2.

Des expériences de marquage métabolique nous ont révélé la présence de trois formes de Cathepsine D, c'est-à-dire les formes précurseur (53 kDa), intermédiaire (47 kDa) et mature (31 kDa). Ceci nous montre que la Cathepsine D néosynthétisée subit au moins deux clivages protéolytiques lors de sa transformation en Cathepsine D mature. La centrifugation en gradient de Percoll d'une fraction L provenant de cellules marquées a montré que les forme mature et intermédiaire sont présentes dans la fraction dense du gradient (fig.3.9). Cette constatation nous laisse penser que le deuxième clivage protéolytique de la Cathepsine D est un processus qui implique les lysosomes denses. D'autre part, la présence de la forme mature dans les fractions moins denses est une indication que la deuxième étape de maturation se déroule pendant la biogenèse des lysosomes denses. Les lysosomes denses peuvent se former soit par maturation d'une structure précurseur, soit par "reformation" à partir d'un compartiment hybride endo-lysosomal de densité intermédiaire (Bright *et al.*, 1997). La distribution de la Cathepsine D dans les fractions d'un gradient de Percoll et, avant

tout, la présence de la forme intermédiaire dans la fraction dense nous ont mené à émettre l'hypothèse que la maturation terminale de la Cathepsine D concerne les "dense core lysosomes" ou se fait parallèlement à la formation des "dense core lysosomes". Cette hypothèse est en accord avec des observations antérieures (Delbrück *et al.*, 1994 ; Gieselmann *et al.*, 1983 ; Rijnboutt *et al.*, 1992).

Les expériences suivantes s'accordent avec cette hypothèse :

- Nous avons observé qu'une surcharge lysosomale en saccharose a un effet inhibiteur tant sur l'apparition des lysosomes denses (fig.3.11) que sur le deuxième clivage protéolytique de la Cathepsine D (fig.3.13). On sait que le saccharose est endocyté par les cellules et s'accumule dans les lysosomes (de Duve and Wattiaux, 1966 ; Cohn and Ehrenreich, 1969) ou dans les endosomes (Bright *et al.*, 1997). Le fait qu'en présence de saccharose, les lysosomes denses "disparaissent", et que la maturation finale de la Cathepsine D soit fortement ralentie ou inhibée, renforce notre hypothèse que le deuxième clivage de maturation est lié aux lysosomes denses.
- Lors d'expériences de maturation *in vitro*, nous avons observé en présence d'ATP une stimulation de la maturation terminale de l'hydrolase. Ces résultats indiquent que le deuxième clivage protéolytique de la Cathepsine D est un processus qui semble lié à l'acidification des granules par la pompe à protons lysosomale. En plus, l'effet du Triton X-100 qui abolit la maturation terminale montre que le deuxième clivage protéolytique, qui transforme la forme intermédiaire en forme mature, nécessite la présence de granules intacts.
- Des renseignements importants concernant la deuxième étape de maturation ont été obtenus en effectuant des maturations *in vitro* de la Cathepsine D provenant de cellules HepG2 incubées en présence de saccharose. Lors de telles expériences, nous avons pu montrer que le saccharose inhibe la transformation en Cathepsine D mature, et ceci même en présence d'ATP. Ces expériences ont posé la question de savoir par quel mécanisme agit le saccharose. On pourrait imaginer que le saccharose, en s'accumulant, entraîne un gonflement des organites, ce qui empêcherait le phénomène d'agrégation du contenu lysosomal, et que cette agrégation soit une condition nécessaire à la maturation terminale de l'hydrolase. Un tel effet montrerait que les

structures denses, à savoir les lysosomes, seraient indispensables pour que se réalise la transformation de la forme intermédiaire en Cathepsine D mature.

- Afin d'avoir plus de renseignements sur cette question, l'on pourrait incuber des granules, provenant de cellules chargées de saccharose, dans un milieu hypertonique. Si une telle expérience montrait qu'il est possible de rétablir la maturation terminale de la Cathepsine D dans une structure dense, en forçant par un effet osmotique les organites à se condenser, on aurait là un argument supplémentaire en faveur de notre hypothèse.
- Une autre possibilité d'action du saccharose serait une augmentation du pH intralysosomal, par inhibition de la pompe à protons des lysosomes (Schmid *et al.*, 1999), en supposant que l'acidification du milieu intralysosomal soit nécessaire au clivage protéolytique de la Cathepsine D. Des estimations du pH intralysosomal sur des cellules normales et des cellules incubées en présence de saccharose, ont montré que le pH à l'intérieur des "sucrosomes" ne semble pas différer du pH intralysosomal de cellules normales. Il faut cependant noter que la technique utilisée pour estimer le pH à l'intérieur des lysosomes, n'est pas entièrement au point. Afin de l'affirmer, il serait important d'effectuer des mesures "témoin" du pH intralysosomal sur des cellules incubées en présence d'un inhibiteur de l'ATPase lysosomale, comme la bafilomycine A (Yoshimori *et al.*, 1991), ou sur des cellules incubées en présence d'une base, comme le NH_4Cl . Si telles conditions expérimentales entraînaient une augmentation nette du pH intralysosomal mesuré, nous pourrions nous assurer que la technique utilisée donne des résultats fiables. Si on pouvait confirmer que le saccharose ne modifie pas le pH intralysosomal en s'accumulant dans les granules, ceci étayerait l'idée que l'inhibition de la formation des lysosomes denses et de la maturation finale de la Cathepsine D n'est peut-être pas due à une augmentation du pH intralysosomal.

En résumé, nos résultats nous laissent penser que l'acidification du contenu intralysosomal entraîne la formation d'une structure dense, qui correspond à une "matrice" organisant le contenu enzymatique des lysosomes, et que cette structuration intervient dans la maturation protéolytique de la Cathepsine D.

Bibliographie

5. Bibliographie

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1994). *Biologie Moléculaire de la Cellule*.

Baranski, T.J., Faust, P.I. and Kornfeld, S. (1990). Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. *Cell* 63, 281-291.

Barriocanal, J.G., Bonifacino, J.S., Yuan, L. and Sandoval, I.V. (1986). Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 261, 16755-16763.

Beaufay, H., Jaques, P., Bauhuin, P., Sellinger, O.Z., Berthet, J. and de Duve, C. (1964). Tissue fractionation studies 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients. *Biochem. J.* 92, 184-205.

Braun, M., Waheed, A. and von Figura, K. (1989). Lysosomal acid phosphatase via the cell surface. *EMBO J.* 8, 14869-14872.

Bright, N.A., Reaves, B.J., Mullock, B.M. and Luzio, J.P. (1997). Dense core lysosomes can fuse with late endosomes and are re-formed from the resultant hybrid organelles. *J. Cell Sci.* 110, 2027-2040.

Buckmaster, M.J., Ferris, A.L. and Storrie, B. (1988). Effects of pH, detergent and salt on aggregation of chinese-hamster-ovary-cell lysosomal enzymes. *Biochem. J.* 249, 921-923.

Capony, F., Braulke, T., Rougeot, C., Roux, S., Montcourrier, P. and Rochefort, H. (1994). Specific mannose-6-phosphate receptor-independent sorting of Procathepsin D in breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* 215, 154-163.

Cohn, Z.A. and Ehrenreich, B.A. (1969). The uptake, storage and intracellular hydrolysis of carbohydrates by macrophages. *J. Exp. Med.* 129, 201-225.

Cuervo, A.M. and Dice, J.F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501-503.

de Courey, K. and Storrie, B. (1991). Osmotic swelling of endocytic compartments induced by internalised sucrose is restricted to mature lysosomes in cultured mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 192, 52-60.

de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissues. *Biochem. J.* 60, 604-617.

de Duve, C. and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 28, 435-492.

Delbrück, R., Desel, C., von Figura, K. and Hille-Rehfeld, A. (1994). Proteolytic processing of cathepsin D in prelysosomal organelles. *Eur. J. Cell Biol.* 64, 7-14.

Erickson, A. (1989). Biosynthesis of lysosomal enzymes. *J. Cell. Biochem.* 40, 31-41.

Faust, P.L., Kornfeld, S. and Chigwin, J.M. (1985). Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D. *Proc. Acad. Sci. USA* 82, 4910-4914.

Febbraio, M. and Silverstein, R.L. (1990). Identification and characterization of lamp-1 as an activation- dependent platelet surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 165, 18531-18537.

Fukuda M. (1994). Biogenesis of the lysosomal membrane. *Subcellular biochemistry* 22, 199-230.

Gieselmann, V., Pohlmann, R., Hasilik, A. and von Figura, K. (1983). Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J. Cell Biol.* 97, 1-5.

Gieselmann, V., Hasilik, A. and von Figura, K. (1985). Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro. *J. Biol. Chem.* 260, 3215-3220.

Granger, B.L., Green, S.A., Gabel, C.A., Howe, C.L., Mellman, I. and Helenius, A. (1990). Characterization and cloning of Igp, a lysosomal glycoprotein from mouse and rat cells. *J. Biol. Chem.* 265, 12036-12043.

Griffiths, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I. and Kornfeld, S. (1988). The mannose-6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 52, 329-341.

Griffiths, G. (1996). On vesicles and membrane compartments. *Protoplasma* 195, 37-58.

Hasilik, A. and Neufeld, E.F. (1980). Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 255, 4937-4945.

Hasilik, A., Pohlmann, R. and von Figura, K. (1983). Inhibition by cyanate of the processing of lysosomal enzymes. *Biochem. J.* 210, 795-802.

Hoff, S., Matsushita, Y., Ota, D.M., Cleary, K.R., Yamori, T., Hakomori, S. and Irimura, T. (1989). *Cancer Res.* 49, 6883-6888.

Hoflack, B. and Kornfeld, S. (1985). Purification and characterization of a cation-dependent mannose-6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver. *J. Biol. Chem.* 260, 12008-12014.

Hopkins, C.R., Gibson, A., Shipman, M. and Miller, K. (1990). Movement of internalized ligand receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature* 346, 335-339.

Ignacio, V.S. and oddmund, B. (1994). Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol.* 4, 292-297.

Isaac, E.L., Karageorgos, L.E., Brooks, D.A., Hopwood, J.J. and Meikle, P.J. (2000). Regulation of the lysosome-associated membrane protein in a sucrose model of lysosomal storage. *Exp. Cell Res.* 254, 204-209.

Jadot, M., Canfield, W.M., Gregory, W. and Kornfeld, S. (1992). Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor. *J. Biol. Cehm.* 267, 11069-11077.

Jadot, M., Wattiaux, R., Mainferme, F., Dubois, F., Claessens, A. and Wattiaux-de-Coninck, S. (1996). Soluble form of lamp-II in purified rat liver lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223, 353-359.

Jadot, M., Dubois, F., Wattiaux-de-Coninck, S. and Wattiaux, R. (1997). Supramolecular assemblies from lysosomal matrix proteins and complex lipids. *Eur. J. Biochem.* 249, 862-869.

Jahraus, A., Storrie, B., Griffiths, G. and Desjardins, M. (1994). Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal/late endosome compartment. *J. Cell Sci.* 107, 145-157.

Kornfeld, S. (1987). Trafficking of lysosomal enzymes. *Faseb. J.* 1, 462-468.

Kornfeld, S. and Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 483-525.

Lloyd, J.B. (1996). Metabolite efflux and influx across the lysosomal membrane. *Subcellular Biochemistry* 27, 361- 386.

Lobel, P., Fujimoto, K.Y.R.D., Griffiths, G. and Kornfeld, S. (1989). Mutations in the cytoplasmic domain of the 275-kDa mannose-6-phosphate receptor differentially alter lysosomal enzyme sorting and endocytosis. *Cell* 57, 787-796.

Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira and Darnell (1997). *Biologie Moléculaire de la Cellule*.

Luzio, J.P., Brian, A.R., Bright, N.A., Pryor, P.R. Mullock, B.M. (2000). Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J. Cell Sci.* 113, 1515-1521.

Matha, V.L., Farnoud, M.R., Lucas, A., Rougeot, C., Garcia, M. and Rochefort, H. (1998). Endocytosis of pro-cathepsin D into breast cancer cells is mostly independent of mannose-6-phosphate receptors. *J. Cell Sci.* 111, 2539-2549.

Mellman, I., Fuchs, R. and Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytid pathways. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 663-700.

Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular storage. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12, 575-625.

Metzelaar, M.J., Wijngaard, L.J., Peters, P.J., Sixma, J.J., Nieuwenhuis, H.K. and Clevers, H.C. (1991). CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein cloned by screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 266, 3239-3245.

Montgomery, R.R., Webater, P. and Mellman, I. (1991). Accumulation of indigestible substances reduces fusion competence of macrophage lysosomes. *J. Immunol.* 147, 3087-3095.

Mullins, C. and Bonifacino, J.S. (2001). The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* 23, 333-343.

Mullock, B.M., Perez, J.H., Kuwana, T., Gray, S.R. and Luzio, J.P. (1994). Lysosomes can fuse with a late endosomal compartment in a cell free system from rat liver. *J. Cell Biol.* 126, 1173-1182.

Mullock, B.M., Bright, N.A., Fearon, C.W., Gray, S.R. and Luzio, J.P. (1998). Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J. Cell Biol.* 140, 591-601.

Munier-Lehmann, H., Mauxion, F. and Hoflack, B. (1995). Carbohydrates recognition proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 133-136.

Needleman, S.B. and Koenig, H. (1974). Isoelectric-fusion behavior of acid hydrolases in rat kidney lysosomes. *Biochem. Biophys. Acta* 379, 43-56.

Novikoff, A.B., Beaufay, H. and de Duve, C. (1956). Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver. *J. Biophysic. And Biochem. Cytol.* 2, 179-184.

Ogata, S. and Fukuda, M. (1993). Lysosomal targeting of Limp-II membrane glycoproteins requires a novel Leu-Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* 269, 5210-5217.

Okhuma, S. and Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurements of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3327-3331.

Ohkuma, S., Moriyama, Y. and Takano, T. (1982). Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2758-2762.

Pfeffer, S.R. (1991). Targeting of proteins to the lysosomes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 170, 43-65.

Reaves, B.J., Banting, G. and Luzio, J.P. (1998). Luminal and transmembrane domains play a role in sorting type I membrane proteins on endocytic pathways. *Mol. Biol. Cell* 9, 1107-1122.

Richo, G.R. and Conner, G.E. (1994). Structural requirements of Procathepsin D activation and maturation. *J. Biol. Chem.* 269, 14806-14812.

Rijnboutt, S., Stoorvogel, W., Geuze, H.J. and Strous, G.J. (1991). Identification of subcellular compartments involved in biosynthesis processing of cathepsin D. *J. Biol. Chem.* 267, 15665-15672.

Rijnboutt, S., Aerts, H.M.F.G., Geuze, H.J., Tager, J.M. and Strous, G.J. (1992). mannose-6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase and sphingolipid-activating protein. *J. Biol. Chem.* 266, 4862-4868.

Rocheffort, H., Capony, F., Garcia, M., Cavaillès, V., Freiss, G., Chambon, M., Morisset, M. and Vignon, F. (1987). Estrogen induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells. A role in carcinogenesis ? *J. Cell Biochem.* 35, 17-29.

Saitoh, O., Wang, W-C., Lotan, R. and Fukuda, M. (1992). Differential glycosylation and cell surface expression of lysosomal membrane glycoproteins in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. *J. Biol. Chem.* 267, 5700-5711.

Salvador, N., Aguado, C., Horst, M. and Knecht, E. (2000). Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J. Biol. Chem.* 275, 27447-27456.

Sarafian, V., Jadot, M., Foidart, J-M., Letesson, J-J., van den Brûle, F., Castronovo, V., Wattiaux, R. and Wattiaux-de-Coninck, S. (1998). Expression of lamp-1 and lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells. *Int. J. Cancer* 75, 105-111.

Schmid, J.A., Mach, L., Paschke, E. and Glössl. (1999). Accumulation of sialic acid in endocytic compartments with the formation of mature lysosomes. *J. Biol. Chem.* 274, 19063-19071.

Stinchcombe, J.C. and Griffiths, G.M. (1999). Regulated secretion from hemopoietic cells. *J. Cell Biol.* 147, 1-5.

Storrie, B. and Desjardins, M. (1996). The biogenesis of lysosomes : is it a kiss and run, continuous fusion and fission process ? *Bioessays* 18, 895-903.

Tjelle, T.E., Brech, A., Juvet, L.K., Griffiths, G. and Berg, T. (1996). Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes : their role in protein degradation. *J. Cell Sci.* 109, 2905-2914.

von Figura, K. and Hasilik, A. (1986). Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 167-193.

Wattiaux, R., Wattiaux-de Coninck, S., Ronveaux-Dupal, M.F. and Dubois, F. (1978). Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient. *J. Cell Biol.* 78, 349-367.

Williams, M.A. and Fukuda, M. (1990). Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* 111, 955-966.

Yamashita, K., Ohkura, T., Tachibana, Y., Takasaki, S. and Kobata, A. (1984). Comparative study of the oligosaccharides released from baby hamster kidney cells and their polyoma transformant by hydrazinolysis. *J. Biol. Chem.* 259, 10634-10640.

Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. and Tashiro Y. (1991). Bafilomycin A₁, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺/ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* 266, 17707-17712.

Zhu, Y. and Conner, G.E. (1994). Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 269, 3846-3851.